

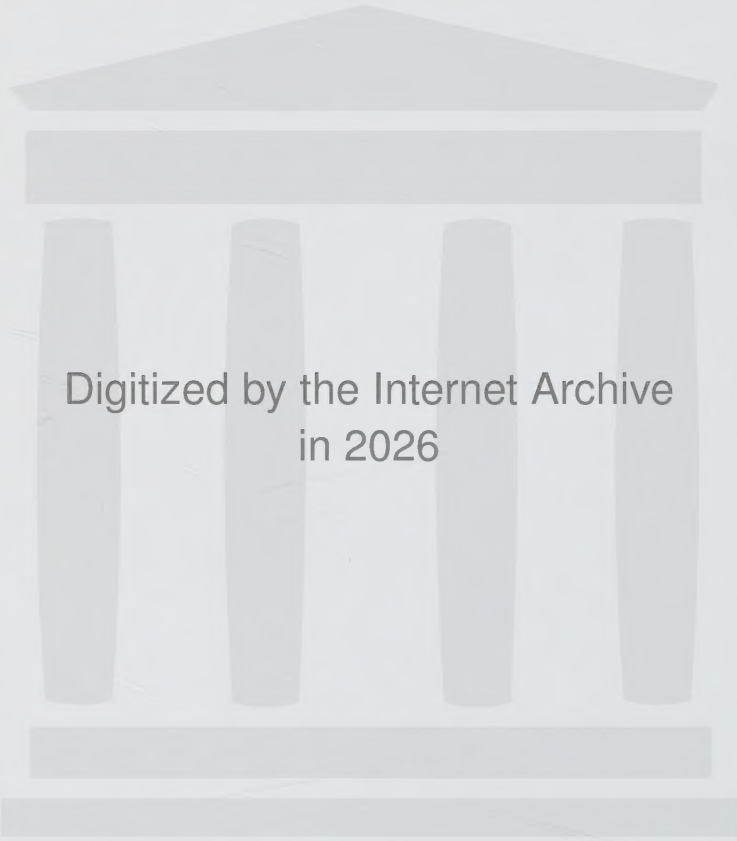
Aus dem Veterinär-Pathologischen Institut
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
(Direktor: Professor Dr. E. Weiß)

Morphologische Differenzierung
der in Monolayer-Kulturen fetaler und postnataler
Rinderhoden wachsenden Zellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Herbert Stieger
Tierarzt aus Krefeld

Gießen 1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545919_0009

Aus dem Veterinär-Pathologischen Institut
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
(Direktor: Professor Dr. E. Weiß)

Morphologische Differenzierung
der in Monolayer-Kulturen fetaler und postnataler
Rinderhoden wachsenden Zellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Herbert Stieger
Tierarzt aus Krefeld

Gießen 1970

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
in Gießen

Dekan: Professor Dr.H.TILLMANN

Berichterstatter: Professor Dr.E.WEISS

Tag der mündlichen Prüfung: 3.Dezember 1970



Meiner Mutter in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Literaturübersicht	
1. Ursprung und Wanderung der Urkeimzellen	2
2. Differenzierung der Keimzelle zur befruchtungsfähigen Gamete	5
3. Entwicklung der männlichen Keimdrüse	12
a. Indifferentes Stadium	12
b. Differenzierung zum Hoden	16
c. Entwicklung der endokrinen Funktion der Gonaden	23
4. Literatur über die Gewebekultur männlicher Gonaden	30
III. Eigene Untersuchungen	35
1. Material und Methodik	35
2. Zellen der Gewebekultur fetaler und postnataler Kälberhoden - eine kurze morphologische Charakterisierung	38
3. Auswertung der eigenen Untersuchungen	44
3.1 Fetale Hodenzellkulturen	44
3.2 Postnatale Hodenzellkulturen	59
IV. Diskussion	72
V. Zusammenfassung	79
VI. Abbildungen	81
VII. Literaturverzeichnis	91
Anhang	

I. EINLEITUNG

Bei über 90% der heterosexuellen Rinderzwillinge besteht ein XX/XY-Blutchimerismus. Die männlichen Partner der Zwicken (Freemartin) besitzen häufig zusätzlich auch noch einen XX/XY-Chimerismus der Hoden. Dieser Befund stellt einen wichtigen Faktor in der chromosomalen Theorie der Zwickenbildung dar. Er wird allerdings dadurch geschmälert, daß man nicht weiß, von welchen Zellen der kultivierten Hoden die Metaphasenplatten, auf Grund derer die Karyogramme aufgestellt werden, stammen.

Im Rahmen unserer Untersuchungen über heterosexuelle Rinderzwillinge wurde daher dem Doktoranden die Aufgabe gestellt, mit morphologischen Methoden einen Teilbeitrag zur Lösung der skizzierten Fragestellung zu liefern.

II. LITERATURÜBERSICHT

- 2 -

1. URSPRUNG UND WANDERUNG DER URKEIMZELLEN

Seitdem sich Wissenschaftler mit der embryologischen Entwicklung der Tiere beschäftigen, nimmt in ihren Arbeiten die Frage nach dem Ursprung der Keimzellen einen ganz besonderen Platz ein.

Die Geschlechtszellen sind nach WEISSMANN (1885) Träger der Erbsubstanz, des Keimplasmas, sie bilden ein "ewiges Kontinuum, von dem sich als zeitbedingte und Veränderungen unterworfenen Produkte, die Lebewesen, abspalten" (FRITZI-NIGGLI 1961). Im Gegensatz zu den Somazellen wird den Keimzellen eine weitgehend selbständige Entwicklung zugeschrieben. Die Abtrennung der Gameten von den Somazellen erfolgt schon sehr früh in der Zygote, da sich in der befruchteten Eizelle das "materielle Substrat" der Keimzelle auf eine spezifische Plasmaformation zurückführen läßt.

Lange Zeit haben sich zwei Auffassungen bezüglich des Entstehungsortes der Urkeimzellen gegenübergestellt:

- I. Die Keimzellen sind gonadalen Ursprunges, sie leiten sich vom Coelomepithel her;
- II. die Keimzellen sind extragonadaler Herkunft:
 - a) sie leiten sich vom Dottersackentoderm her,
 - b) sie stammen zwar vom Dottersackblastomeren, degenerieren aber, sobald sie im Gonadenbereich angelangt sind, und erst die sekundären, aus dem Coelomepithel hervorgehenden Geschlechtszellen sind entwicklungsfähig.

Aus der Vielfalt der herrschenden Theorien seien hier kurz die wichtigsten wiedergegeben:

WALDEYER (1870) sieht in den Urkeimzellen modifizierte Coelomepithelzellen.

BALFOUR (1878, zit.n.v. WILHARTEK) spricht den Zellen des Keimepithels eine Pluripotenz zu, durch die sie fähig sein sollen, Urkeimzellen hervorzubringen.

WEISSMANN (1885) hält die Urkeimzellen für Zellen "sui generis", die aus keinem der drei Keimblätter hervorgehen; seiner Auffassung nach sind sie vielmehr schon seit Beginn der ontogenetischen Entwicklung als spezifische Elemente existent.

FELIX (1912) unterscheidet zwei Kategorien von Geschlechtszellen: er nennt sie primäre und sekundäre Keimzellen - "primary and secondary genital-cells". Die primären Genitalzellen entwickeln sich extragonadal aus dem Blastomer, gelangen zum Keimfeld und degenerieren dort. Die sekundären Keimzellen hingegen gehen aus dem Keimepithel der Gonaden hervor und sind zur Oogenese bzw. Spermiogenese imstande.

KOHNO (1925) stellt bei seinen Untersuchungen an menschlichen Embryonen extragonadale Keimzellen fest, die aufgrund ihrer Eigenbeweglichkeit vom Darmepithel über das Mesenterium in den Gonadenbereich einwanderten.

SIMKINS (1928) hält die Urgameten für transformierte Gonadenzellen. Er erwähnt in seiner Untersuchung zwar genitaloide Zellen - "genitaloid cells" -, diese sollen aber der Degeneration verfallen bzw. teilweise zu Leydigzellen werden.

WITSCHI (1948) versucht nachzuweisen, daß die Genitalzellen aus dem Entoderm des Dottersackes bzw. von primitiven Stammzellen, die ihrerseits ebenso entodermalen Ursprungs sind, stammen und von dort über den Enddarm zur Gonadenregion gelangen.

MINTZ (1960) sieht bei Mäuseembryonen die ersten Urkeimzellen im entodermalen Dottersack nahe der Allantois stehen.

OHNO und CROFT (1965) und JOST und FRÉLIN (1966) gelingt es, die Urkeimzellen des bovinen Embryos mittels des Enzyms alkalische Phosphatase sichtbar zu machen und ihren Entstehungsort und Wanderweg zur Keimfalte aufzuzeichnen. Sie sind der Meinung, daß sich die Urkeimzellen vom Dotterentoblasten herleiten.

CUMINGE und DUBOIS (1969) gehen in ihrer Arbeit über den Einwanderungsmechanismus der Urgameten in die Gonadenleiste ebenfalls davon aus, daß die Urgeschlechtszellen extraregionären Ursprungs sind. Sie werden infolge chemotaktischer Reize seitens des Keimepithels angezogen und dringen dort durch ihre amoiboide Bewegungsfähigkeit aktiv in die Keimleiste ein. Die dabei zu Grunde gehenden Zellen phagozytieren sie oder lösen sie kraft

ihrer lytischen Aktivität auf und pinozytieren sie als kleine

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß zur Zeit die Auffassungen von JUST und FRÉRIK, FINTZ und CUMINGE u. DUBOIS als zutreffend angesehen werden: Die Urkeimzellen sind entodermalen Ursprungs und entstehen extragonadal im Bereich des Dottersackes.

Damit stellt sich aber die Frage nach dem Weg und der Art und Weise der Keimzellwanderung von ihrem Entstehungsort zu ihrem Ziele. Die Fortbewegung der Urkeimzelle auf dieser Bahn vollzieht sich aktiv und passiv. Geschlechtszellen sind, wie KOHNO (1925, Mensch), WILSCHAL (1948, Mensch), JUST u. FRÉRIK (1966, Rind) und CUMINGE und DUBOIS (1969, Huhn) nachgewiesen haben, in der Lage, sich amöboid zu bewegen. Sie vermögen Pseudopodien zu bilden, die in vorgebildete Hohlräume und Zwischenzellspalten eindringen, diese erweitern und gleichsam den restlichen Zellkörper nachziehen. An der Vorderseite der Keimzellen vermutet man die Lagerung proteolytischer Enzyme - daher auch die Bezeichnung als lytische Seite der Geschlechtszellen, welche Hohlräume und Kanäle bilden. Eine Urkeimzelle in einem lytisch aktiven Zustand soll daran zu erkennen sein, daß der vordere Teil der Zellmembran nur noch undeutlich oder gar nicht mehr zu sehen ist.

Der passive Weg zum Ziel führt nach DANESCHKOFF (1932, Geflügel), OHNO, TRUJILLO, STERNUS, CHRISTIAN und REPLITZ (1962, Rind) und OHNO u. CROFF (1965, Rind) über die Blutbahn; die Keimzellen sollen durch chemotaktische Stoffe angezogen werden, die im Gonadenbereich freigesetzt werden.

Die Keimbahn verläuft meist zweiphasig: Vom Dottersack gelangen die Genitalzellen zum ventralen Darmtoderm und über das dorsale Mesenterium zur Gonadenanlage. Einige andere verlassen den Dottersack und bewegen sich durch das Mesenchym direkt zum Keimfaltengebiet.

Auf diese Weise erreichen nach JUST und FRÉRIK (1966) die ersten Urkeimzellen des bovinen Embryos ungefähr am 32. Tag p.c. die Urniere. Dort angelangt, sammeln sie sich an der medialen Seite und dringen in das nun als Keimepithel bezeichnete Coelomepithel ein. Entscheidend dafür sind, wie bereits ausgeführt, nach CUMINGE und DUBOIS (1969) ihre amöboide Beweglichkeit und

Phagozytose- und Pinocytosefähigkeit.

Während die Urkeimzellen bei Mensch, Meerschweinchen, Maus und Ratte als eine große, leicht von den Somazellen zu differenzierende Zelle mit großem, runden Kern und einem schmalen Zytoplasmasaum beschrieben wird, sehen OHNO und CROOK (1965) und JOST und PRÉPIN (1966), daß sich die Urgeschlechtszelle des Rindes von den umgebenden Zellen weder durch ihre Größe noch durch einen höheren Glykogengehalt unterscheidet. Einzig durch ihren Gehalt an alkalischer Phosphatase sei sie von den übrigen Zellen der Keimleiste zu trennen. Nach MATSCHKE und ERICKSON (1969) dagegen hat die Urkeimzelle des Rindes einen großen runden Kern mit bis zu drei Nukleolen, wodurch sie von den Somazellen zu unterscheiden sei.

2. DIFFERENZIERUNG DER KEIMZELLE ZUR BEFRUCHTUNGSFÄHIGEN GAMETE

Entwickelt sich die Keimleiste nun zur weiblichen oder männlichen Gonade, so beginnt für die Urkeimzellen, jetzt auch Oogonien oder Spermatogonien genannt, die Oo- oder Spermatogenese.

Die Oogenese gliedert sich in 3 Phasen: in die Vermehrungsperiode, in die Wachstumsperiode und in die Reifungsperiode, zwischen den einzelnen Abschnitten bestehen fließende Übergänge, so daß mehrere Phasen nebeneinander zur gleichen Zeit ablaufen können.

In der Vermehrungsphase herrscht die Mitose vor, die Zahl der Oogonien erhöht sich, aus der primären Oogonie wird die sekundäre; die Wachstumsphase führt die an Umfang zunehmende Oogonie zur Oozyte 1. Ordnung, die in der anschließenden Reifeperiode zur befruchtungsfähigen Gamete wird:

I. Vermehrungsperiode:

Sie beginnt beim bovinen Embryo mit einer SSL von 3 cm. Unmittelbar vor einer Mitose verdoppelt sich das genetische Material des Kerns (Replikation der DNS). Die nachfolgende Zellteilung gliedert sich in 5 Abschnitte:

1. Prophase: Anstelle des Kernes werden feine, sich allmählich verkürzende Fäden sichtbar, doppelt konturiert werden sie an einer Stelle durch ein Zentromer zusammengehalten, die Kernmembran hat sich aufgelöst.
2. Prometaphase: Die Kernspindeln treten auf, die Chromosomenfäden beginnen sich in der Äquatorialplatte zu lagern.
3. Metaphase: Die Chromosomenfäden werden kürzer, rücken voneinander ab und ordnen sich jetzt nun vollends in der Äquatorialplatte; die durch Längsspaltung aus einem Chromosomenfaden entstandenen zwei Chromatiden werden nur noch durch das Zentromer gehalten, während ihre beiden Enden auseinanderklaffen.
4. Anaphase: Die Zentromeren teilen sich, die Chromatiden (Tochterchromosomen) wandern mit Hilfe des Spindelapparates an die beiden nun entstandenen Pole.

Es beginnt die Einschnürung des Zelleibes in der vormaligen Äquatorialplatte als Zeichen der bald folgenden Zytoplasmatteilung.

5. Telophase: Die Zellabschnürung ist beendet, die Spindeln bilden sich zurück. Die bisher deutlich als Fäden sichtbaren Chromatiden lösen sich wieder auf, werden von einer Kernmembran umgeben und stellen nun die Kerne der neu entstandenen Zellen dar.

Die Mitose ist damit abgeschlossen, es sind zwei diploide Tochterzellen entstanden, die bis zur nächst folgenden Mitose in die Interphase eintreten.

Jede dieser beiden Zellen besitzt das volle Erbmaterial.

II. Wachstumsperiode:

In dieser Zeit treten am Kern keine Veränderungen auf, nur der Zelleib nimmt an Umfang zu, aus der sekundären Oogonie wird die Oozyte I. Ordnung.

III. Reifeperiode:

Dieser Entwicklungsabschnitt beginnt beim Rinderfetus etwa bei

einer SSL von 6-7 cm, er umfaßt die Meiose mit 2 Teilungsvorgängen. Sinn der Meiose ist es, der endgültigen befruchtungsfähigen Keimzelle die Hälfte des genetischen Materials (haploid) mitzugeben, damit bei der Befruchtung wieder eine Zelle mit vollem (diploiden) Chromosomensatz entsteht. Vor Eintritt in die Meiose I wird das genetische Material verdoppelt.

Die 1.meiotische Reifeteilung läßt im wesentlichen die gleichen Stadien wie die Mitose unterscheiden. Charakteristisch ist ihre lang dauernde Prophase. Sie gliedert sich in 5 Stadien:

1. Leptotaenstadium: Die Chromosomen des Kernes sind zu langen, dünnen Fäden ausgezogen, sie enden entweder frei oder kehren zurück und bilden eine Schleife. Die Anordnung der Chromosomenfäden erinnert an ein Bouquet, weshalb dieses Stadium auch das "Bouquetstadium" genannt wird.
2. Zygotaenstadium: In dieser Phase findet die Chromosomenkonjugation statt, zwei homologe Chromosomen (väterliches und mütterliches) lagern sich aufeinander und paaren sich so, daß die entsprechenden Chromomeren der beiden Paarlinge unmittelbar gegenüberliegen. In dieser Stellung kann das "crossing-over", ein Austausch von Genen zwischen Kopplungsgruppen, eintreten.
3. Pachytaenstadium: Die Chromosomenfäden werden kürzer und dicker, am Ende dieses Stadiums beginnt sich schon die spätere Teilung der Chromosomen abzuzeichnen.
4. Diplotaenstadium: Die Chromosomenfäden sind dünn und durch die im Pachytaenstadium schon begonnene Teilung viertelig geworden, sie verlaufen nun paarweise, bisweilen umeinander gewunden und nur an den Enden vereint.
5. Diakinesestadium (Ruhestadium): Das letzte Stadium der Prophase der 1.meiotischen Teilung ist erreicht, der Kern nimmt wieder Interphasenform an, die Chromosomenfäden verschwinden, der Kern wird von einem feinen Chromatinnetzwerk ausgefüllt.

Die oben genannte 5.Phase erreicht der Oozyt des Rinderfetus gegen Ende der fetalen Entwicklung, in ihr verharret er bis kurz

vor der Geschlechtsreife.

Nach SAKAI (1955) findet man das Diplotaen- und das Diakinese-stadium beim weiblichen Rind nur in Follikeln.

Mit Einsetzen der Pubertät läuft die Reifeperiode wieder an, der diploide Oozyt I setzt die Meiose I fort, indem er die Metaphase I, Anaphase I und die Telophase I durchläuft. Diese Phasen ähneln im wesentlichen denen bei der Mitose beschriebenen, allerdings mit dem Unterschied, daß sich in der Metaphase I nicht die Tochterchromatiden voneinander entfernen, sondern die homologen Chromosomen. Damit bekommen die Tochterzellen nun den einfachen (haploiden) Chromosomensatz, aber die volle DNS-Menge. Diese Teilung wird daher als Reduktionsteilung bezeichnet. An den Polen angekommen, formieren sich die Chromosomen wieder zum losen Knäuel mit dünner Kernwand, die Telophase I ist erreicht.

Bei der nachfolgenden Zellplasmateilung entstehen zwei verschiedene Zellen: der Oozyt II.Ordnung und das 1.Polkörperchen, das im Gegensatz zum Oozyt II nur einen geringen Eiplasmaanteil erhält. Bei der Meiose I erfolgt zwar eine äquale Kernteilung, aber eine inäquale Plasmateilung.

In der Literatur sind verschiedene Auffassungen darüber zu finden, ob die Reduktionsteilung während der Meiose I oder während der Meiose II stattfindet.

KALMUS (1966) und HAMMERT (1968) vertreten die Meinung, daß sie bei Chromosomenreduktion in der I.Meiose eintritt, während die Meiose II eine einfache Äquationsteilung darstellt. Demgegenüber vertreten ZIETSCHMANN und KRÖLLING (1955), FERNER (1957), STARCK (1965) und WOJKOWSKY (1968) die Ansicht, die Reduktionsteilung vollziehe sich erst in der Meiose II, da erst nach dieser das genetische Material des Kernes (DNS) in der Zelle dem haploiden Satz entspricht.

Sobald die 1.Reifeteilung beendet ist, folgt die 2.meiotische Reifeteilung. Der Oozyt II.Ordnung befindet sich inzwischen im Tertiärfollikelstadium. Zwischen beiden Teilungen kann eine Interphase eingeschoben werden. Zum Zeitpunkt der Ovulation setzt die 2.Reifeteilung ein. Hierbei handelt es sich um eine einfache Äquationsteilung - "mitotische Meiose" - der haploide Oozyt II und das 1.Polkörperchen teilen sich. Sie durchlaufen

die Prophase II, die Metaphase II, die Anaphase II und die Telophase II. Alles dies geschieht wiederum unter der gleichen Gesetzmäßigkeit wie in der mitotischen Karyokinese.

Durch diese letzte Zellteilung entsteht das Reifei, Ovium, und das 2. Polkörperchen: das Ziel der Oogenese ist erreicht, aus der diploiden Oogonie sind vier Gonen entstanden, von denen allerdings nur eine befruchtungsfähig ist. Die Polkörperchen werden bei der Befruchtung abgestoßen und gehen zugrunde.

Die Telophase II vollzieht sich bei Rind, Katze, Hund und Mensch erst nach der Befruchtung im Eileiter, bleibt diese aus, wird die 2. Reifeteilung nicht beendet.

Warum die embryonale Oogenese im Diplotaen- bzw. Diakinese-stadium stehen bleibt, ist noch nicht bekannt. Nach der Ansicht von MAULEON (1969) soll die Ursache dafür eine nicht homologe Vereinigung der bivalenten Chromosomen sein.

Es wurde verschiedentlich auch die Dauer der einzelnen Prophaseabschnitte gemessen; so ermittelte KULLICH (1969) für das Zygotäenstadium der Maus 40h, für das Pachytäenstadium 6h, für das Diplotaenstadium 8h (die Kürze des Diplotaenstadiums beruht bei der Maus darauf, daß noch während der embryonalen Entwicklung die erste Reifeteilung beginnt).

Spermatogenese:

In den zahlreichen Arbeiten über die Spermatogenese bei Mensch und Tier sind sehr unterschiedliche Auffassungen über den Ursprung der Samenmutterzellen zu finden. Danach entstehen die Samenmutterzellen einmal aus den indifferenten Hodenzellen, ein anderes Mal sollen sie ¹⁹⁵⁴ direkt aus den Urkeimzellen hervorgehen. MISCHATSCH (1933), ARLEY (zit. n. SANTAMARINA und REEGL 1957) und SANTAMARINA und REEGL (1957) unterscheiden beim Rind in den embryonalen Keimsträngen zwei Zelltypen: die kleinen und die großen Zellen. Die kleinen Zellen, basal auf der Tunica propria der Keimstränge gelegen, sind ca. 10-12 μ groß, sie stellen die mit den primären Keimsträngen in die Tiefe gewachsenen Coelomzellen der Coelomepithelschicht dar.

MISCHATSCH (1933) nennt diese Zellen auch die "indifferenten Hodenzellen". Die großen Zellen hingegen sind die Urkeimzellen,

die nach SANTAMARINA und REECE (1957) zunächst zwischen den kleinen Zellen liegen und später zum Keimstrangzentrum aufsteigen und dann im gesamten Hodenstrang zu finden sind; sie haben etwa eine Größe von ca. 15-18 μ . Im Laufe der weiteren Hodenentwicklung vergrößern sich die großen Zellen noch mehr, sie hypertrophieren. SANTAMARINA und REECE (1957) nennen sie dann "Riesensamenmutterzellen". Zur Zeit der Geburt des Kalbes beginnt dann die Degeneration der großen Zellen; am 45. Tag sollen nach SANTAMARINA und REECE (1957) und nach MISCHATSCH (1933) alle großen Zellen verschwunden sein, ohne "eine Spur zu hinterlassen oder eine Funktion ausgeübt zu haben". Während dieser Zeit verändern sich die kleinen Zellen, sie nehmen an Umfang zu und werden zu Samenmutterzellen; ein anderer Teil von ihnen differenziert sich zu Sertolizellen.

Aus den ehemaligen Coelomzellen können also sowohl Spermatogonien als auch Sertolizellen entstehen, während die eigentlichen Urkeimzellen für die Spermatogenese ohne jede Bedeutung sind.

Ganz entgegengesetzter Auffassung sind ROSEN-RUNGE-GIESEL (1950), ROSEN-RUNGE-BARLOW (1953), ZIETSCHMANN-KRÖLLING (1955), KNUDSEN u. BRYNE (1963), ABDEL-RAOUF (1960) und STARCK (1965). Nach ihrer Meinung sind die Urkeimzellen der Ausgangspunkt der Spermatogenese. Die basal gelegenen kleinen Zellen nennt STARCK (1965) "undifferenzierte Epithelzellen", von denen ein Teil der Degeneration verfällt, während sich der Rest dieser Zellen zu Sertolizellen differenziert. ABDEL-RAOUF (1960) nennt die ehemaligen Coelomzellen BIS-Zellen (basal indifferent supporting cells), die sich zunächst mitotisch vermehren und Tochterzellen in das Zentrum der Keimstränge abgeben; diese stellen die CIS-Zellen dar (central indifferent supporting cells). Etwa die Hälfte der BIS-Zellen degeneriert, der Rest differenziert sich zu Sertolizellen; bei den CIS-Zellen hingegen fallen alle der Degeneration anheim.

Die Urkeimzelle wird bei STARCK (1965) und bei MATSCHKE und ERIKSON (1969) als Stammzelle, bei ROSEN-RUNGE-BARLOW (1953), ZIETSCHMANN-KRÖLLING (1955) und KNUDSEN u. BRYNE (1963) hingegen als Spermatogonie A bezeichnet.

Die Samenmutterzellen treten zwischen der 18. und 23. Woche postnatal in die Spermiogenese ein, kurz vor der Pubertät tritt dazu noch die Spermioghistogenese.

Ebenso wie bei der Oogenese lassen sich auch bei der Spermatogenese das Vermehrungsstadium von dem Wachstumsstadium und von dem Reifestadium trennen.

Vermehrungsphase:

In der Vermehrungsphase, die nach MATSUIKE und ERINSON (1969) bereits am 200. Tag p.c. beginnen soll und die während des gesamten Geschlechtslebens anhält, teilen sich die Samenmutterzellen in rhythmisch aufeinander folgenden Wellen. Bis zur Pubertät nimmt so die Zahl der Spermatogonien A zu. Danach aber teilt sich die Spermatogonie A sowohl in eine Spermatogonie B als auch in eine Spermatogonie A, - die den Spermatogonienstamm darstellt. Auf die morphologischen Unterschiede zwischen beiden Zelltypen wird später noch eingegangen.

Wachstumsphase:

Dieser Entwicklungsabschnitt beginnt kurz vor der Pubertät, die Spermatogonien B nehmen an Umfang zu und werden zu Spermatozyten, am Kern treten keine Veränderungen auf.

Reifestadium:

Der Spermiozyt 1. Ordnung unterzieht sich nun der 1. Reifeteilung, er durchläuft dabei die gleichen Phasen, wie sie für den Oozyten 1. Ordnung beschrieben wurden, allerdings mit dem Unterschied, daß sich der 1. Prophase der 1. meiotischen Teilung kein Diakinesisstadium anschließt.

Ebenso wie bei der Oogenese vollzieht sich auch während der 1. Reifeteilung der Spermatogenese die Chromosomenreduktion, so daß am Ende der Meiose I zwei chromosomal-haploide Spermiozyten II. Ordnung entstanden sind. Wogleich erfolgt die 2. Reifeteilung, die wiederum eine einfache Äquationsteilung darstellt; aus den beiden Spermiozyten II (Graespermiden) gehen vier haploide befruchtungsfähige Spermiden hervor.

Im Gegensatz zur Oogenese entstehen also bei der Samenbildung aus einer Samenmutterzelle vier befruchtungsfähige Gameten, wäh-

rend aus einer Oogonie von den vier haploiden Eizellen nur eine befruchtungsfähig ist; die restlichen drei sind rudimentär.

Bis zur befruchtungsfähigen Spermie muß die Spermidie noch die Reifung oder Spermiohistogenese durchmachen: Der Zellkern nimmt längliche Form an und plattet sich von der Seite her ab; damit wird der Kern der einstigen Spermatogonie zum Kopf des Samenfadens. Aus dem Zentrosom entstehen zwei Zentriolen, die an die gegenüberliegenden Oberflächen des Spermidenleibs wandern. Das peripher stehende distale Körperchen treibt eine Wimper aus, die den künftigen Achsenfaden darstellt. Später erhält dieser von seiten des Zellprotoplasmas eine Scheide, wodurch der Spermien-schwanz gebildet wird.

3.. ENTWICKLUNG DER MÄNNLICHEN KEIMDRÜSE

a) Indifferentes Stadium

Die embryonale Gonadenentwicklung der Haussäugetiere weist zwei Stadien auf: ein indifferentes und ein differenziertes. Im ersteren, das auch das Keimleistenstadium genannt wird, verläuft die Entwicklung von Hoden und Ovar gleich; eine endgültige Unterscheidung zwischen beiden ist zu dieser Zeit noch nicht möglich; erst im zweiten Stadium tritt eine Geschlechtsdifferenzierung ein.

Als ersten Hinweis für das baldige Auftreten der Keimdrüsen ist nach OHNO u.CROFF (1965), JOST u.FREPIN (1966) und MATSCHKE u.ERIKSON (1969) bei einem bovinen Embryo von 0,8-0,9 cm SSL die deutliche Konzentration einiger Urkeimzellen medial an der Urniere zu werten. MATSCHKE u.ERIKSON (1969) zählten am 33.Tag post conceptionem ca.44 Keimzellen. Wie oben schon erwähnt, gehen die Urgeschlechtszellen aus dem Dotterentoblasten hervor; am 32.Tag p.c. sahen JOST u.FREPIN (1966), daß sich die Urkeimzellen am medialen Rand der Urniere konzentrieren. Dies ist zu diesem Zeitpunkt das einzige Kriterium, welches den späteren Gonadenbereich markiert; jedoch schon zwischen 1- und 1,5 cm SSL hebt sich von der medialen Urnieren-seite eine strang- oder kamm-artige Leiste ab. Sie verläuft entlang der gesamten Urnieren-

seite und stellt die Keimleiste dar. Ihre Entstehung verdankt sie dem plötzlich einsetzenden Wachstum des medialen Urnierenmesenchyms, welches das Coelomepithel, dessen Zellen inzwischen zylindrische Formen angenommen haben, in das Abdomen vorwölbt (v.BEEK 1923, v.MÖLLENDORF 1957, ZIETSCHMANN-KRÖLLING 1955, STARCK 1965). SIEVERING (1969) vermutet sogar, daß die dort liegenden Urkeimzellen die Ursache für die plötzlich einsetzende Gewebsproliferation sind. Ebenfalls auf der Urniere verläuft der Wolff'sche Kanal, das embryonale Exkretionsorgan der Metanephros. In diesem Stadium besteht die Keimdrüse aus 3 Komponenten: den Coelomzellen: polyedrisch, protoplasmareich mit einem zentral gelegenen runden Kern, dem Mesenchym, einer noch homogenen und strukturlosen Masse, in der spindelförmige Kerne eingelagert sind, und den bis zu 20 µ großen Urkeimzellen. Diese Zellen sind, abgesehen von ihrer Größe, noch durch einen großen runden Kern, der von einem schmalen Zytoplasmasaum umgeben ist, gekennzeichnet und daher gut von den Somazellen zu unterscheiden (RUBASCHKIN 1909, Msch; EVERETT 1945, Vertebraten, DEBYRE, 1933, Msch). MATSCHKE u.ERIKSON (1969) beschreiben die Keimzelle des Rindes ebenso, fügen aber noch hinzu, daß im Kern der bovinen Urgeschlechtszelle 1-3 acidophile Nukleoli zu finden sind.

OHNO u.GROFF (1965) und JOST u.ERLICH (1966) hingegen stellen, wie bereits erwähnt, fest, daß sich die Urkeimzellen beim Rind weder durch ihre Größe noch durch einen höheren Gehalt an Glykogen von den Somazellen unterscheiden.

Die beiden Gewebsanteile: Coelomepithel und Mesenchym sind durch eine dünne, aus sich kreuzenden Protoplasmafibrillen bestehende Membran voneinander getrennt; daneben besteht als weitere Differenzierungsmöglichkeit die Beurteilung der unterschiedlichen Lage und Gestalt von Mesenchym und Coelomepithelzellkernen: die Kerne des Coelomepithels sind oval und stehen senkrecht zur Basis, während die ellipsoiden Kerne des Mesenchyms parallel dazu liegen.

Die noch zunächst strangartige Gonadenanlage erfährt zwischen 1,5-2,0 cm SSL eine weitere Veränderung: ihre kranialen und kaudalen Teile laufen papillenförmig aus; ihr medialer Anteil jedoch wächst weiter und stellt die eigentliche Keimdrüsenanlage dar.

Noch während der gleichen Zeit treten an mehreren Stellen des Coelomepithels Zellzapfen auf, die, vom Coelomepithel ausgehend, in das Innere des Organs vordringen. Dies sind die primären Keimstränge oder auch primäre Pflügersche Schläuche genannt. In ihnen liegen Keimzellen, die mit in die Tiefe genommen werden. Über die eigentliche Entstehungsursache der Keimstränge herrschen zur Zeit verschiedene Theorien; SIEVERING (1969) vermutet, daß die im Coelomepithel liegenden Keimzellen entweder eine keimstranginduzierende Wirkung besitzen, indem sie das Coelomepithel zu lokalen Zellproliferationen anregen, oder die ins Innere der Gonade wandernden Geschlechtszellen ziehen die Coelomepithelzellen gleichsam mit sich hinab.

Zunächst noch mit dem Oberflächenepithel verbunden, erfolgt zwischen 2,0 und 2,5 cm SSL ihre Trennung durch die primäre Tunica albuginea, die unterhalb des inzwischen mehrschichtig gewordenen Coelomepithels als dünne, noch nicht ganz durchgehende Membran aus Stromazellen auftritt. Nach CHAFIN (Rind, 1917), v.BEEK (Rind, 1923) und v.MÖLLENDORF (1957, Mensch) soll zu dieser Zeit anhand der Urkeimzellverteilung in der Gonade, des Ausbildungsgrads der Tunica albuginea und des Coelomepithels schon eine Geschlechtsdifferenzierung möglich sein: Entwickelt sich die Gonade zum Ovar, so sind die Urgeschlechtszellen zum größten Teil im 3-4schichtigen Coelomepithel zu finden; die primäre Tunica albuginea ist nur schwach und bruchstückhaft ausgebildet.

Differenziert sich die Keimdrüse hingegen zum Hoden, so nimmt die Zahl der Urkeimzellen in den peripheren Zonen des Organs ab, während sie im Gonadenzentrum ansteigt (CROPP u. OHNO, 1966); das Epithel ist nur einschichtig und die primäre Tunica albuginea stellt eine deutliche, jedoch noch nicht die ganze Gonade umhüllende Stromaschicht dar.

Im Verlauf dieser Zeit hat sich zwischen Urniere und Gonade ein kurzes Gekröse entwickelt; es entsteht aus dem Peritonealüberzug der sich zurückbildenden Urniere. Medial des Wolffschen Kanals tritt eine gratartige Erhebung auf: die erste Anlage des Müllerschen Ganges. Am Fetus selbst wächst zwischen Schwanzwurzel, Hintergliedmaßen und Nabel der Genitalhöcker aus.

Tab. I

Indifferentes Stadium der
Entwicklung der Keimdrüse beim Rind

	SSL cm	Urkeimzelle	Keimleiste	prim. Tun.albug.	prim. Keimstränge	Reteblastem
32. Tg.	0,8- 0,9	dt.Konzentra- tion der Ur- keimzellen am med.Rand d. Urnieren				
35. Tg.	1-1,5	Urkeimzellen im Coelomepi. u.Mesenchym	am med.Rand d.Urnieren eine strang- artige Leiste	eine aus sich kreuz- enden Pro- toplasma- fibrillen bestehende Membran, sie trennt Coe- lomepi. u. Mesenchym		
38. Tg.	1,5-2	Urkeimzellen z.T.schon in den prim.Keim- strängen	kran.u.kaud. Teil laufen papillenför- mig aus, med. Anteile ent- wickeln sich zur Gonade weiter		v.d.zwei- schichtigen Coelomepi. gehen zapfen- artige Zell- proliferatio- nen zentral- wärts	
42. Tg.	2-2,5	Zahl d.Urkeim- zellen nimmt zu, vornehmlich i.Coelomepi. (Keimepi.) lo- kalisiert.	med.Gonaden- teil hebt sich als linsenkorn- gr.Organ von d.Urnieren ab, kran.u.kaud. Teil nur noch bandförmig.	die Membran- stücke ver- binden sich zur ge- schlossenen Hülle.	Trennung vom Coelomepi. durch Tunic. albug.	strangartige Zellansammlung, vom Gonaden- hilus i.d. Mesenchym ein- dringend.
47. Tg.	2,5	Ende des Keimleistenstadiums - Beginn der Geschlechtsdifferenzierung				

Damit endet der undifferenzierte Entwicklungsabschnitt der Gonade. Sie ist ein medial an der Urniere gelegenes, grauweißes Organ, dessen kraniale und kaudale Teile reduziert sind; sie bilden den Bandapparat der Gonade mit. Sie setzt sich aus Coelomepithel - nun auch Keimepithel genannt -, Mesenchym - auch als Stroma oder interstitielles Gewebe bezeichnet -, den primären Keimsträngen der Urkeimzellen und aus der primären Tunica albuginea zusammen.

Nun folgt die Differenzierung in Hoden und Ovar; dieser Zeitpunkt wird für den bovinen Embryo von vielen Autoren unterschiedlich angegeben: BASCOM (1923): 3,0 cm SSL, BISSONETTE (1924): 2,5 cm SSL, v.VLOTEN (1932): 2,2 cm SSL, v.BEEK (1932): 2,1 cm SSL, THOMPSON (1942): 2-3 cm SSL, SAKAI (1955): 3 cm SSL, ZIETSMANN u.KRÖLLING (1955): 1,9-2,1 cm SSL, KREHBIEL (1963): 2-2,5 cm SSL.

b) Differenzierung zum Hoden

Die Differenzierung zum Hoden vollzieht sich bei der bovinen Rindergonade etwa zwischen 2,0 und 2,5 cm SSL, -zwischen dem 34. und 36.Tag post conceptionem. Die männliche Keimdrüse selbst hat zu diesem Zeitpunkt eine Länge von ca. 0,2-0,3 mm und liegt an der medialen Seite der Urniere. Am kaudalen Pol des Hodens tritt das Reteblastem auf; es wird z.T. auch schon im indifferenten Stadium beobachtet. Über seine Genese herrscht Unklarheit: einmal soll es eine Ausstülpung der Baumannschen Kapsel sein, die während der Urnierenentwicklung durch Abplattung der Zellen des dem wolffschen Gang gegenüberliegenden Endes des Urnierenkanälchens entsteht (WALDEYER 1870, WILSON 1926) - ein anderes Mal wird es als eine Einstülpung des kaudalen Drittels der Keimfalte gesehen (ALLEN 1904); und schließlich als eine Modifizierung der im frühen Gonadenstadium tief in der Keimdrüse liegenden undifferenzierten Zellen, die sich strangförmig anordnen (GRÜNWALD 1943).

Bei dem Reteblastem handelt es sich im frühen Hodenstadium um einen soliden Zellstrang aus basophilen, ovalen kernen, die parallel zum Längsdurchmesser der Gonade liegen. Im Verlauf der weiteren Entwicklung erhalten die Zellstränge sehr früh ein Lumen.

Als Rete testis bezeichnet, stellt es dann die Verbindung zwischen den samenbereitenden und den samenabtransportierenden Hodenabschnitten dar. Die schon im undifferenzierten Stadium beschriebenen primären Pflügerschen Schläuche wachsen weiter auf das Reteblastem zu und schieben die primäre Tunica albuginea vor sich her. Ca.95% der Samenmutterzellen befinden sich nach THOMSON (1942) in diesen primären Keimsträngen, während nur 5% im teilweise zweischichtigen Coelomepithel verbleiben (ALLEN 1904, BASCOM 1923, THOMSON 1942).

Zwischen 3 und 4 cm SSL tritt die sekundäre Tunica albuginea auf; die männliche Gonade erreicht eine Größe von 0,8-1 mm. Unterhalb des Coelomepithels lagern sich Bindegewebszellen membranartig zusammen, wodurch die primären Keimstränge getrennt werden. In dem noch recht spärlichen interstitiellen Gewebe mesenchymalen Ursprungs, das zwischen den Hodensträngen erscheint, fallen nach BASCOM (1923), MISCHATSCH (1933) und SANTAMARINA und REECE (1957) im bovinen Embryo große blasenartige Zellen mit exzentrisch gelegenen Kernen auf, - die ersten Leydigzellen. Die gleiche Beobachtung machte auch WHITEHEAD (1904) beim 5 Wochen alten Schweineembryo (SSL: 3 cm). CHAFIN (1917) hingegen sah Leydigzellen erst bei einem 7 cm großen Rinderembryo. Während sich die interstitiellen Zellen beim Schweineembryo schon bald nach ihrer Entstehung zurückbilden, nimmt ihre Zahl beim Rinderembryo kontinuierlich zu. Erst kurze Zeit nach der Geburt sollen diese degenerieren. Es entstehen dann neue Leydigzellen, die "Leydigzellen der zweiten Generation" (MISCHATSCH 1933). SANTAMARINA und REECE (1957), KARG und STRUCK (1966) hingegen bezweifeln diese Diskontinuität der Leydigzellen für das Rind.

Das Reteblastem ist weiter in das Hodenparenchym eingedrungen; es ist verzweigt, jedoch noch nicht kanalisiert. Mit zunehmender Länge der primären Pflügerschen Schläuche hat sich der Abstand zwischen ihnen und dem Rete verringert.

Parallel zur Entwicklung der Gonaden zum Hoden verläuft auch die Differenzierung der sekundären Geschlechtsmerkmale, auf die hier aber nicht näher eingegangen werden soll (ALLEN 1904, WHITEHEAD 1904, v.VLOTEN 1932, KREHBIEL 1963, BLACK u. CHRISTENSEN 1969).

Bei einer SSL von 4-5 cm umgibt die nun deutlicher auftretende sekundäre Tunica albuginea als geschlossene Hülle das Hodenparenchym; sie besteht aus spindelförmigen, lamellär geordneten Bindegewebszellen (Fibroblasten). Das Organ hat nun typische Hodenform angenommen; es ist ca. 1-2 mm groß und grau-weiß lateral der Nachniere gut zu erkennen. Die äußeren Geschlechtsorgane weisen den gleichen Entwicklungsstand auf wie im 3-4 cm-Stadium (BISSONNETTE 1924, ZIETSCHMANN und KRÖLLING 1955, KREHBIEL 1963).

Mit 5-6 cm SSL treten die ersten Anastomosen zwischen den Hodensträngen unterhalb der Tunica albuginea auf; deutlich sind die axial in den Keimsträngen gelegenen Gonozyten zu sehen.

Im Kapitel über die Spermatogenese wurde schon auf die recht unterschiedlichen Meinungen hinsichtlich des Ursprunges der Spermatogonien hingewiesen, ebenso große Unklarheit herrscht auch in der Benennung der Samenmutterzellen: ZIETSCHMANN und KRÖLLING (1955) und STARCK (1965) bezeichnen die in den primären Keimsträngen auftretenden Gonozyten als Spermatogonien. CROFF und OHNO (1966) sprechen die Gonocyten als Spermatogonien an, sobald sie für alkalische Phosphatase negativ sind (SSL 4 cm). Nach MATSCHKE und ERIKSON (1969) tritt die Umwandlung der Urkeimzellen in Spermatogonien erst am 200.Tag p.c. auf. Wie bereits oben erwähnt, beschreiben letztere die Gonocyten als eine große Zelle, deren Kern 1-3 Nukleoli besitzt. Die nach dem 200.Tag auftretenden Keimzellen aber nennen sie Spermatogonien A. Diese haben nur 1 Nukleolus, auch soll das Chromatin in den Kernen dieser Zellen feiner verteilt sein als in den Kernen der Gonozyten. LEBLOND und CLERMONT (1952) differenzieren bei der Ratte die Spermatogonien nochmals in Spermatogonie A und Spermatogonie B.

Beide Zelltypen unterscheiden sich durch ihre Chromatinverteilung: Spermatogonien Typ A (auch Dust-like-type genannt) ist durch eine staubkornartige Chromatinverteilung im Kern gekennzeichnet, es ist im Tubulus contortus stets basal auf der Tunica propria zwischen den Sertolizellen zu finden. Aus dieser Zelle geht die Spermatogonie Typ B hervor (auch als Crust-like-type bezeichnet). Bei dieser haftet das Chromatin wie eine Kruste von unterschiedlicher Dicke an der Kernmembran. Sie stellt den Aus-

gangspunkt der Spermatogenese dar. KNUDSEN und BYRNE (1960) führen noch eine dritte Spermatogonienform an: den Intermediären-Typ (In-Typ); er entsteht aus der Samenmutterzelle vom A-Typ durch eine mitotische Teilung und soll sich durch ein sehr grobes Chromatinnetz auszeichnen.

Zur gleichen Zeit beginnt nun der Processus vaginalis als Ausstülpung des embryonalen Bauchfelles auszuwachsen (ALLEN 1904, BASCOM 1923, v.VLOTEN 1932, ZIETSCHMANN-KRÖLLING 1955, KREHBIEL 1963).

Zwischen 6 und 7,5 cm SSL verändert sich das Bild gegenüber dem vorhergehenden Stadium nur geringfügig: die primären Pflügerschen Schläuche nehmen allmählich eine radiäre Stellung um das Reteblastem ein; durch anhaltende Zellvermehrung verlaufen einige schon gewunden. Im Reteblastem treten die ersten Lumina auf, so daß dieses jetzt als Rete testis bezeichnet wird. An einigen Stellen wird die sekundäre Tunica albuginea zweischichtig. Der Hoden berührt nur noch den kaudalen Pol der Nachniere, - kranial ist er mit dem Zwerchfellurnierenband verbunden, das durch die Rückbildung des kranialen Urnienteiles entsteht; kaudal ist er am Gubernakulum Hunteri befestigt. Dieses setzt sich aus beiden degenerierten kaudalen Anteilen der Keimdrüse und der Urniere zusammen (CHAFIN, 1917, BISSONETTE, 1924, v.VLOTEN, 1932).

Bei einer SSL von 8-10 cm erreicht der Hoden eine Größe von 1-2 mm. An den schon stärker gewundenen Hodensträngen tritt erstmals eine Basalmembran, Tunica propria, auf, die nach MISCHATSCH (1933) aus retikulären Fasern bestehen soll. Auf ihr reihen sich die Coelomepithelzellen der Keimstränge. MISCHATSCH (1933) bezeichnet sie als undifferenzierte Hodenzellen, aus denen später Sertoli-Zellen hervorgehen sollen. ABDEL-RAOUF (1960) hingegen nennt sie, wie bereits erwähnt, BIS-Zellen (basal indifferent supporting-cells), einige von ihnen entwickeln sich weiter zu Sertolizellen, die übrigen degenerieren.

Die Samenmutterzellen vermehren sich weiter mitotisch, sie liegen immer noch axial. Der Abstand zwischen dem Rete testis und den Hodensträngen verkleinert sich weiter, an einigen Stel-

len trennt beide nur noch die primäre Tunica albuginea (ALLEN 1904, BASCOM 1923, MISCHATSCH 1933, ABDEL-RAOUF 1960).

Diese geht bei einer SSL von 10-12 cm teilweise in das interstitielle Gewebe über, so daß nun Hodenstränge und Rete testis an einigen Stellen in Verbindung stehen. Der zunächst seitlich der Gonade gelegene Nebenhodenkopf gelangt nun kranial des Testikels und umgibt diesen von proximal. Das Caput epididymidis entsteht aus den 5-12 Urnierenkanälchen, dem Sexualteil der Urniere, die im Gegensatz zu den übrigen Urnierenkanälchen trotz des Verlustes ihrer sekretorischen Fähigkeit nicht degenerieren. Sie bilden die Coni vasculosi und stellen die Verbindung zwischen dem Rete testis und dem Wolffschen Kanal her, der postembryonal zum Nebenhodenkanal und zum Samenleiter wird. Der Müllersche Gang ist inzwischen zum größten Teil zurückgebildet (ALLEN 1904, CHAFIN 1917, BASCOM 1923, ZIETSCHMANN u.KRÖLLING 1955, KREHBIEL 1963).

Mit 12-14 cm SSL verlassen die Samenmutterzellen, deren Zahl inzwischen auf 4,1 Millionen angestiegen ist, teilweise ihre axiale Lage und lagern sich auf der Basalmembran zwischen den Coelomzellen der Hodenstränge (MATSCHKE u.ERIKSON 1969). Die Zweischichtigkeit der sekundären Tunica albuginea mimmt zu, so daß nun eine obere Bindegewebsschicht (Tunica fibrosa) von der darunter liegenden Gefäßschicht (Tunica vasorum) zu unterscheiden ist. Die Keimdrüse liegt nun etwa in der Mitte zwischen kaudalem Nierenpol und dem Proc.vaginalis (CHAFIN 1917, BASCOM 1923, ZIETSCHMANN u.KRÖLLING 1955, KREHBIEL 1963).

Zwischen 14 und 20 cm SSL erreicht der Hoden eine Länge von ca.4 mm; das Coelomepithel stellt nur noch eine einschichtige Zellage dar, - darunter die zweiteilige Tunica albuginea. Daran anschließend folgt der Bereich der Hodenstränge: auf der deutlich sichtbaren Basalmembran sitzen die nun als undifferenzierte Hodenzellen (MISCHATSCH 1933) oder auch als Bis-Zellen (ABDEL-RAOUF 1960) ansprechbaren Coelomzellen der primären Flügerschen Schläuche.

Sowohl zwischen den indifferenten Hodenzellen auf der Basalmembran als auch axial befinden sich Samenmutterzellen.

Von diesem Zeitpunkt an treten Degenerationerscheinungen an den Spermatogonien erstmals auf (Keimzellmauserung)(v.VLOTEN 1932, MATSCHKE-ERIKSON 1969).

Infolge fortlaufender Zellvermehrung verlängern sich die Hodenstränge, so daß sie in zahlreichen Windungen von der Tunica albuginea bis zum Rete testis verlaufen. An der Tunica albuginea sind nahezu alle Keimstränge miteinander in Verbindung getreten und bilden zum Rete hin offene Bögen. HUCKENS (1957) wies bei Ratten zwei Hodenstrangformen nach: die äußeren, die Bindegewebetskapsel berührenden Stränge und die in diesen verlaufenden inneren Stränge; letztere erreichen die Tunica albuginea nicht. Zwischen den Pflügerschen Schläuchen vermehrt sich das interstitielle Gewebe; in einer noch nicht näher differenzierten Grundsubstanz, die sich in der HE-Färbung homogen rot darstellt, liegen zahlreiche runde und spindelförmige Kerne (CHAFFIN 1917, BASCOM 1923).

Gegen Ende des 20 cm Stadiums bietet der fetale Hoden folgendes Bild: Inmitten der radiär angeordneten Hodenstränge liegt das Rete testis; stark verzweigt und nahezu vollkommen kanalisiert, tritt es immer mehr mit den Keimsträngen in Verbindung. Währenddessen hält der Descensus testiculi weiter an; entlang dem Gubernakulum Hunteri wandern die Hoden allmählich zum Processus vaginalis des Skrotums.

Die Ursachen des plötzlich einsetzenden Gonadenabstieges sollen nach ZIETSMANN u.KRÖLLING (1955) einmal das gegenüber dem Leitband schnellere Wachstum der dorsalen Lende und der inguinalen Bauchwand sein, zum anderen aber auch ein direkter Retraktionsprozeß des Gubernakulums.

Das Ende des Hodenabstieges wird unterschiedlich angegeben, die dafür in der Literatur angeführten Zeiten schwanken zwischen 10 und 52,5 cm SSL: CHAFFIN (1917): 17 cm, v.BEEK (1923): 9-10 cm, v.VLOTEN (1932): 52,5 cm, THOMPSON (1942): 10 cm, SAKAI (1955): 15 cm, HENRICSON u.RAJAKOSKI (1958): 36 cm.

In diesem Entwicklungsstadium verharret der fetale Hoden bis zur Geburt und noch einige Zeit darüber hinaus. Abgesehen von einer Größenzunahme und einer Vermehrung der Spermatogonien zwischen dem 200. und 270.Tag auf 13,4 Millionen, treten während

dieser Zeit keine Veränderungen auf (MATSCHKE u.ERIKSON 1969).

In den ersten drei Wochen nach der Geburt hat der Kälberhoden noch fetalen Aufbau: solide, mit einer strukturlosen Substanz ausgefüllte Hodentubuli, einer breiten Basalmembran, der im Durchschnitt 13-15 BIS-Zellen palisadenartig, mit ihrer Längsachse senkrecht zur Tunica propria aufsitzen. In 75% der Hodentubuli befinden sich pro Tubulusquerschnitt 1-4 Spermatogonien. Die Hodenkanälchen sind etwa 48 μ breit und durch ein ausgeprägtes, kernreiches Stroma voneinander getrennt (MISCHATSCH 1933, SANTAMARINA und REECE 1957, ABDEL-RAOUF 1960 u.1961).

Zwischen der 4.-11.Woche nimmt die Zahl der BIS-Zellen erheblich zu, dadurch entstehen die zum Teil auch schon innerhalb der ersten 3 Wochen in manchen Tubuli angetroffenen CIS-Zellen. An vielen Samenmutterzellen machen sich Degenerationerscheinungen bemerkbar, teilweise schwellen sie um das 2-3fache ihrer normalen Größe an (Riesenspermatogonien nach SANTAMARINA und REECE 1957), teilweise aber weisen sie Kernmembrandefekte auf, so daß der Zellkern nierenförmig aussieht. In Einzelfällen sind Zell- und Kernmembran sogar vollständig verschwunden und das Kernchromatin ist nur noch als dunkle, schwach sichtbare Punkte in der Tubulisubstanz erkennbar (ABDEL-RAOUF 1960 u.1961).

In diesem Entwicklungsstadium treten nach MISCHATSCH (1933) die ersten Leydigzellen der postnatalen Phase auf.

In der 12.-17.Woche erreicht die Degeneration der Samenmutterzellen ihren Höhepunkt. Auch die Zahl der BIS-Zellen erreicht ihr Maximum. Die Hodentubuli haben einen Durchmesser von ca.50 μ , sie weisen noch keine Lumina auf und sind durch ein sehr ausgeprägtes intertubuläres Stroma voneinander getrennt (MISCHATSCH 1933, SANTAMARINA und REECE 1957, ABDEL-RAOUF 1960).

Während der 18.bis 23.Woche nähern sich die Hodentubuli und treten teilweise miteinander in Kontakt, es entstehen die sog. Triangel, die mit Leydigzellen und Bindegewebe ausgefüllt sind. Die Tubuli erhalten Lumina. Im Durchschnitt befinden sich im Querschnitt eines Hodenkanälchens 26 BIS-Zellen, 2-3 CIS-Zellen und 3-7 Spermatogonien. In dieser Zeit setzt auch die Spermio-

genese ein. In zunächst noch vereinzelt Tubuli entwickeln sich aus den Spermatogonien primäre Spermiozyten: große, runde Zellen mit ebenfalls großen runden Kernen, in denen das Chromatingerüst deutlich sichtbar ist (MISCHATSCH 1933, ABDEL-RAOUF 1960 u.61).

Zwischen der 24. und 35. Woche verringert sich sowohl die Zahl der BIS-Zellen als die der CIS-Zellen; ein Teil der BIS-Zellen entwickelt sich zu Sertolizellen, der restliche Teil fällt ebenso wie die CIS-Zellen der Degeneration anheim.

Der Sertolizellkern ist oval bis dreieckig und unmittelbar auf der Basalmembran gelegen. Zwischen ihnen befinden sich Spermatogonien, deren Zahl stetig anwächst. In den meisten Tubuli läuft die Spermiohistogenese an, neben den bereits erwähnten Spermiozyten treten nun auch Spermiden und vereinzelt auch Spermien auf. Bei den Spermiden handelt es sich um kleine runde Zellen mit einem ebenfalls kleinen runden Zellkern und dunkel gefärbten Chromatingranula.

Am Ende der 35. Woche sind in den Hodentubuli neben den Sertolizellen nur noch Zellen der Spermiogenese anzutreffen, BIS- oder CIS-Zellen sind verschwunden. Das Tier befindet sich in der Geschlechtsreife (MISCHATSCH 1933, SANTAMARINA und REECE 1957, ABDEL-RAOUF 1960 u.61).

c) Entwicklung der endokrinen Funktion der Gonaden

In Hoden und Eierstock setzt die endokrine Tätigkeit zu ganz verschiedenen Zeiten ein. Während sie im Ovar erst spät in der Gestationsphase, mit fortschreitender Eireifung anläuft, beginnt diese im Hoden schon im frühembryonalen Stadium. Die endokrin aktiven Zellen in den Testes sind die Leydigzellen, die schon im ganz frühen embryonalen Entwicklungsstadium von der Hypophyse, die ebenfalls sehr früh ausgebildet ist, reguliert und stimuliert werden (KARG und STRUCK 1966).

Nach BASCOM (1923) und SANTAMARINA und REECE (1957) treten beim Rinderfetus schon im 3 cm SBL-Stadium erstmalig Leydigzellen auf. Während sie sich nach BASCOM (1923) von dieser Zeit an kontinuierlich vermehren, unterliegen sie nach SANTAMARINA und

Tab. II

Differenzierung und Entwicklung des fetalen Rinderhodens

Gest.-zeit +SSL	Größe, Lage d. Hodens	Keimepithel (Coelomepi.)	Rete testis	prim. Keimstränge	Keimzellen	prim. T.alb. sek. T.alb.	Leydig-Z. Stroma
2-2,5 ca. 41. Tg.	0,2-0,5 mm, rundlich, med. an d. Urniere gelegen, grau-weiß	Keimepithel 1-2 Kerne dick	Reteblastem als Zellansam- mlung am Kaud. Pol d. Hodens	wachsen wei- ter zentral- wärts, sie ste- hen nicht mehr mit d. Keimepi. in Verbindung	Keimzellen im Gesamten Organ vor allem im Zentrum, diffus verteilt; (95% i. d. prim. Keim- str., 5% im Keimepi.)	prim. T.alb.: eine durch- gehende, dun- ne geschlos- sene Hülle	vereinzelte Stromagewebe zwischen d. Keimstr.
3-4 45.- 50. Tg.	0,8-1 mm, Lage, Aussehen u. Gestalt un- verändert	unverändert	Rete testis dringt tiefer ins Hodenparen- chym ein u. ver- zweigt sich	weiteres Län- genwachstum	unverändert	sek. T.un.alb. tritt unter- halb d. Keim- epi. auf.	im Stroma treten Ley- dig-Zellen auf
4-5 50.- 53. Tg.	1-2 mm, etwas lat. d. Nachnie- re gelegen, grau-weiß, hodenartig	unverändert	Rete testis verzweigt sich zuneh- mend	Längen- wachstum	Gonocyten lie- gen in den fe- talen Tubuli.	sek. T.alb. bildet eine geschlossene Hülle	unverändert
5-6 53.- 56. Tg.	1-2 mm; Hoden berührt d. Kaud. Pol d. Nachnie- re; Kran. durch d. Zwerchfell urnierenbd., Kaud. durch d. Gubernaculum hinteri. ge- halten	unverändert	unverändert	einige Hoden- str. treten unterhalb d. sek. T.un.alb. miteinander in Verbindung	Spermatogonien nun axial i. d. Keimstr. gele- gen	sek. T.alb. stellenweise zweischich- tig	unverändert

6-7, 5 56.- 61. Tg.	1-2 mm	unverändert	im Rete tre- ten erste Lumina auf	Hodenstr. neh- men teilweise schon radiäre Stellung um das Rete ein	Gonocyten axial i. d. Ho- denstr. sich mitot. teilend	unverändert	Stromamasse nimmt zu
8-10 9-10 Wo	1,9 mm, Lage unverändert	unverändert	Rete stark verzweigt, mehr u. mehr teilweise Äste erhal- ten ein Lumen	Hodenstränge verlaufen teilweise schon Ge- schlängelt, an einigen tritt eine Basalmembran auf	unverändert	Zweischich- tigkeit d. T. alb. wird deutlicher; prim. T. alb. nur noch als dünne Faser- schicht er- kennbar	Stroma diffe- renz. sich in Fibro- u. Histiozyten
10-12 10-11 Wo.	2-2,5 mm; d. bisher seit- lich gelegene Nebenhodenkopf gelangt kran. u. umgibt d. Hodenkopf v. kaud.	unverändert	unverändert	Hodenstränge u. Rete nur noch durch dünne p. Tun. alb. getrennt, an einigen Stellen berüh- ren sich Rete u. Keimstrang	Gonocyten im- mer noch axial gelegen.	sek. Tun. alb. unverändert	unverändert
12-14 11-12 Wo.	3, 1-3, 2 mm; d. grau-weiße Organ befindet sich i. d. Mitte zwischen kaud. Nierenpol u. Proc. vaginal.	unverändert	Rete beina- he vollstan- dig kanali- siert	mehr Hodenstr. erhalten eine Basalmembran; sie verlaufen stark ge- schlängelt; d. Verbindungen zwischen d. Rete u. d. Ho- denstr. nehmen zu.	einige Sperma- tog. verlassen d. axiale Lage u. gelangen so basal zwischen d. BIS-Zellen.	prim. T. alb. geht in d. interstitiell- le Gewebe über	zwischen d. Hodensträng. nimmt d. inter- st. Gewebe zu.

14-20 12.- 15.Wo.	-4,0 mm; d. Descensus testis hält weiter an	Keimepi. nur noch einschichtig	unverändert	alle Hodenstränge mit einer Basalmembran ausgestattet, auf ihr sind d. Zellen d. prim. Keimstränge aufgereiht, dazwischen liegen Kerne u. einige Samenzellen	Spermatog. weiterhin i. d. Wachstumsphase	a. d. Tun. alb. ist d. Gefäßschicht v. d. Bindegewebschicht u. Kernschicht zu unterscheiden	interstitielles Gewebe sehr ausgeprägt u. kernreich, Zelligzellen an manchen Stellen zu erkennen.
25 17.Wo.	4-5 mm, Descensus beendet, Hoden befinden sich im Skrotum.	Keimepi. unverändert einschichtig	Rete stark verzweigt, fast vollständig kanalisiert, mit d. größten Teil d. Hodenstr. verbunden.	noch nicht kanalisiert, sonst unverändert.	unverändert	sek. T. alb. ist nun durchgehend zweischichtig.	interstitielles Gewebe u. Leydigzellen nehmen zu.
bis zur Geburt	abgesehen von einer Größenzunahme treten keine Veränderungen mehr auf!						

Tabelle III

Entwicklung des postnatalen Hodens bis zur Geschlechtsreife

Alter	Tunica albug.	interst.Gewebe	Hodentubuli	Spermatogonien	Rete testis
1.-3.Wo.	dicke zweischichtige Tunica albug.: aus d.Tun. fibrosa und d. 2-3mal so dicken Tun. vasorum bestehend	interst.Gewebe strukturiert: Leydigzellen u. Bindegewebszellen.	bereits Tun.prop., 13-15 dIS-Zellen, einige CIS-Zellen	Spermatogonienin 75% aller Tubuli, ca. 1-4 pro Tubulusquerschnitt. Tubuli ca. 48 μ Durchmesser.	
4.-11.Wo.	unverändert	Auftreten d. Leydigzellen d. postnatalen Phase	noch nicht kanalisiert, außen eine ausgeprägte Tun. propria, sie berühren sich noch nicht. BIS-Zellen vermehren sich; vereinigt CIS-Zellen.		
12.-17.Wo.	unverändert	interst.Gewebe noch immer sehr ausgeprägt	dIS-Zellen erreichen ihren Höhepunkt, Hodentubuli 50 μ Durchmesser, noch keine Lumina	Viele Spermatog. zeigen Degenerationsscheinungen.	unverändert
18.-23.Wo.	unverändert	interst.Gewebe nur noch auf Triangel beschränkt, besteht ganz aus Leydigzellen und Bindegewebszellen	Hodentubuli treten miteinander in Kontakt, sie ernalten Lumina. 26 BIS-Zellen, 2,5 CIS-Zellen/Tub.	Vermehrung d. Spermatogonien, 5, 4-7, 7 Tub., erstes Auftreten v. prim. Spermiozyten.	unverändert
24.-35.Wo.	unverändert		alle Hodentubuli nun kanalisiert, ein Teil d. BIS-Zellen wird zu Sertolizellen, d. restl. Teil degeneriert, samtl. CIS-Zellen degener.	Beginn d. Spermio-genese	Rete testis u. Hodentubuli stehen nun miteinander in Verbindung
Pubertät					

ALLEN (1957) und ROBINSON (1959) nach der Geburt einer Degeneration und erst einige Zeit später sollen dann die sog. Leydigzellen der "zweiten Generation" entstehen und die innere Sekretion im Hoden übernehmen. KARG und STRUCK (1966) bezweifelt diese Diskontinuität der Leydigzellentwicklung für das Rind.

Als gesichert und bewiesen hingegen gilt, daß die Zwischenzellen im 3 cm-Stadium endokrin aktiv sind, darauf weist die Anwesenheit von 5 α -ol-Dehydrogenase hin, die bei Mensch, Maus und Meerschweinchen eindeutig nachgewiesen werden konnte. Dieses Enzym gilt als Indikator einer ablaufenden Steroidsynthese (NIEMLI und TROSEL 1961).

KARG u. STRUCK (1966) stellten nun fest, daß im embryonalen Rindernoden vorwiegend Testosteron synthetisiert wird, während der Androstendion-Anteil gegen Ende der Trächtigkeit zunimmt. Nach BURKE (1961) hat ersteres entscheidenden Einfluß auf die Geschlechtsdifferenzierung, da es diejenigen Zellelemente in der undifferenzierten Keimdrüse fördert, die die Gonade zu einem Hoden machen.

Schon ALLAN und SCOTT (1905, zit.n. BURNS) vermuteten, daß Geschlechtshormone oder hormonähnliche Substanzen für die Geschlechtsdifferenzierung entscheidend seien, und sie hatten auch den Leydigzellen dafür einen wichtigen Anteil zugeschrieben; denn sie stellten fest, daß gerade zur Zeit der Geschlechtsdifferenzierung bei ihren untersuchten Schweinehodern ungewöhnlich viel interstitielles Gewebe auftrat. - Daß es sich bei diesen hormonähnlichen Substanzen tatsächlich um männliche Hormone handelte, bewiesen, wie oben schon erwähnt, NIEMLI und KOLLEN (1961) und FRISCH und GRILZ (1965). Letztere legten Organkulturen von Prostatagewebe adulter Ratten an und fanden heraus, daß dieses bei Anwesenheit von Androgenen gut wuchs. Auf die gleiche Weise kultivierten sie frühembryonale Meerschweinchen Hoden mit solchem Prostatagewebe und sahen, daß dieses wuchs. In den von ihnen verwendeten Hoden waren Leydigzellen morphologisch noch nicht zu erkennen gewesen. Daraus folgern sie, daß diese Zellen nicht nur schon vorhanden sind, noch ehe man sie erkennen kann, sondern daß sie auch zu diesem frühen Zeitpunkt schon inkretorisch aktiv waren.

Nach PRICE und ORTIZ (1965) macht die Gonade 2 Entwicklungsphasen durch: eine unhormonale und eine hormonale Entwicklung. Während des ersten Stadiums entwickelt sie ein spezifisches Enzymmuster, das als Rezeptor für das Androgen dient.

Bei Anwesenheit von Leydigzellen diffundiert das von diesen produzierte Androgen zu dem Enzymmuster und verbindet sich mit diesem. Dadurch sollen nun Stoffwechselvorgänge beeinflusst werden, in Folge derer alle jene Keimdrüsenelemente, die diese in Richtung Hoden transformieren können, einen Wachstumsimpuls erhalten, während solche Gonadenstrukturen, die zur Ovarentwicklung führen, degenerieren. Fehlen hingegen die Leydigzellen, so fehlt das Androgen, es findet keine Verbindung zwischen den spezifischen Enzymen und dem Sexualhormon statt und der umgekehrte Vorgang läuft ab, d.h. diejenigen Gonadenteile, die die ovariellen Komponenten in sich bergen, wachsen nun vermehrt aus.

Nach BURNS (1961) und WITSCHI (1965) soll die Geschlechtsdifferenzierung auf einem Cortico-Medullären Antagonismus beruhen; danach ist die Cortex der Induktor der Ovarialdifferenzierung und die in ihr liegenden Keimzellen werden zu Oogonien. Die Medulla hingegen führt zur Hodenentwicklung, die im Mark liegenden Urkeimzellen werden zu Samenmutterzellen. Als Regler zwischen beiden werden chemische Induktorsubstanzen vermutet, die je nachdem, ob die Gonade sich zum Ovar oder Hoden entwickelt, entweder zur Dominanz der Cortex oder der Medulla führen. MAULEON (1969) nennt diese Substanzen Cortexin und Medullarin, über ihre Struktur ist noch nichts näher bekannt.

Ganz im Gegensatz zu den oben angeführten Theorien zur Geschlechtsdifferenzierung lehnt JOST (1967) eine Geschlechtsdifferenzierung auf hormoneller Grundlage ab. Die eigentlichen Faktoren der unterschiedlichen Geschlechtsausprägung sind seiner Meinung nach noch nicht bekannt.

SORSBY (1953) erklärt die Entwicklung der Keimdrüse mit dem Einfluß von Wirkstoffen der Chromosomen, die in allen Körperzellen gebildet werden, sog. Chromosomenhormonen.

ZOLDEK und COLFF (1924) und COLFF und ZOLDEK (1925) versuchten als erste die Züchtung von Gonadengewebe: sie kultivierten menschliche Ovarien.

Bei den meisten Veröffentlichungen auf diesem Gebiete handelt es sich um virologische Studien, in denen Monolayerkulturen der verschiedensten Organe, darunter auch von Kälberhoden, auf ihre Eignung zur Züchtung oder Identifizierung von Viren diskutiert werden. Auf die Morphologie und Differenzierung der in den Kulturen gewachsenen Zellen wird nicht oder nur sehr kurz eingegangen. Wesentlich geringer sind im Vergleich dazu die Anzahl derjenigen Publikationen, die sich mit Gonadengewebekulturen zum Zwecke einer Zellidentifizierung befassen. Als Ausgangsmaterial dieser Arbeiten werden Keimdrüsen von Pferden, Rindern, Kälbern, Lämmern, Schweinen, Kaninchen, Ratten, Meerschweinchen und Affen verwendet.

Nur eine kleine Anzahl von Wissenschaftlern hat den Versuch unternommen, innerhalb einer Hodenzellkultur eine Zelldifferenzierung durchzuführen. In ihren Arbeiten kommen sie zu ganz unterschiedlichen Ergebnissen:

FADIN, ANDRIESEN und DABY (1957) kultivierten Nieren, Leber, Lunge, Ovarien und Hoden verschiedener Haus- und Laboratoriumstiere. In den Hodenzellkulturen wachsen eine Mischung von Sertolizellen und Fibroblasten. Sie geben allerdings nicht an, anhand welcher Merkmale sie beide Zelltypen voneinander unterscheiden haben.

FERRIS und FLOWRIGHT (1958) kultivieren die trypsinierten Hoden von Pferden, Schweinen und Kälbern in Hank's Medium: Sie erkennen, daß in jungen, noch nicht dichten Kulturen die Zellen zunächst noch schmal und länglich sind; mit zunehmender Dichte werden sie jedoch polygonal und breiter, so daß sie als Fibroblasten angesprochen werden können. Daneben enthalten die Zellsuspensionen noch zahlreiche Gewebestückchen, die aus Tubuli-Fragmenten bestehen. Aus diesen Klonen wachsen zunächst gut erkennbare und von den fibrozytenartigen Zellen unterscheidbare Zellen epithelialen Charakters aus, die Inseln bilden.

JORDAN, KATSH und de STACKELBURG (1961) bringen Hoden adulter Meer-

schweinchen in Kultur. Als Medium verwenden sie Earlsche Salzlösung, der Hirscheserum und Laktalbuminhydrolysat, Kükenembryoextrakt, Vitamine und Antibiotika zugesetzt sind. Darin wird das in 0,25% Trypsin vorbehandelte Ausgangsmaterial suspendiert. Die Bebrütungstemperatur beträgt 37°C. Einige Kulturen sind bis zu 37 Tage alt und älter. Die mit Zellen bewachsenen Deckgläser fixieren sie mit 10%igem neutralen Formalin und färben dann mit einer kombinierten Färbung für DNS, Polysaccharide und Protein. Die Zellkerne erscheinen blau-grün, das Zytoplasma gelb, die Polysaccharide des Golgiapparates der Spermatozyten rot.

Die Autoren unterscheiden drei verschiedene Kernformen:

a) die Sertolizelle, - eine epitheliale Zelle, deren ovoider, von einer scharf gezeichneten Kernmembran umgebener Nukleolus meist 3 Kernkörperchen besitzt. Im retikulären Zellplasma befinden sich fibrilläre Mitochondrienstrukturen und mehrere Plasmainschlüsse. - b) die Leydigzelle, - eine ebenfalls epithelartige Zelle mit länglichem Kern, stark granuliertem Zytoplasma und zahlreichen neutralfett- und lipoidpositiven, perinukleären Einschlüssen; - und c) die verschiedenen Keimzellen: primäre und sekundäre Spermiozyten, Spermiden und Spermien. Von diesen kennzeichnen sie aber nur die primären und sekundären Spermiozyten näher als große runde Zellen mit nahe den Kernen gelegenen DNS-haltigen idiosomatischen Granula. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Zellen befinden sich die Keimzellen nicht auf der Objektträgeroberfläche, sondern schwimmen im Medium. Die Verfasser differenzieren die Keimzellen in primäre und sekundäre Spermiozyten, aus denen sich in der Kultur Spermien entwickeln. Als Beweis dafür weisen sie auf die in den Keimzellen gefundenen Meiosefiguren hin. Einschränkend sagen sie allerdings, daß sie nicht sicher sind, ob es sich bei den gefundenen Spermiden und Spermien um das Ergebnis eines wirklichen Reifungsprozesses handelt oder ob diese bereits mit in die Primärkultur gebracht worden sind.

HESS, MAY und PATTY (1963) züchten Lämmerhodenzellen. Die in PBS mit 0,25% Trypsin vorbehandelten Gewebstückchen suspendieren sie in Earlscher Lösung, der Aminosäuren, Vitamine, Glutamin und 10% Lämmerserum zugesetzt sind. Die Bebrütungstemperatur beträgt 37°C. In ihren Primärkulturen erhalten sie eine Mischung ver-

schiedener, nicht näher beschriebener Zelltypen, wobei fibroblastenartige überwiegen. Mit fortschreitender Kultivierungszeit und Zunahme der Subkulturen erhalten sie reine Fibroblastenkulturen. Diese Zellen sind länglich und besitzen einen spindelförmigen Kern.

TSYKIN (1963) kultiviert Affenhoden. Zunächst wachsen sowohl epitheliale als auch bindegewebige Zellen. Während zu Anfang die epithelialen Anteile überwiegen, werden diese später von den schneller wachsenden bindegewebigen Elementen der Zellkultur zurückgedrängt. Die Fibroblasten transformieren sich zu epithelartigen Zellen, die nur mit Hilfe der Heidenhainschen Färbung und der Silberimprägnation nach Snasarev als Bindegewebszellen zu identifizieren sind.

STEINBERGER (1965) und STEINBERGER u. STEINBERGER (1966) untersuchen Zellkulturen aus Hoden adulter und nicht adulter Ratten. Die in kleine Stückchen zerschnittenen Gewebeteile waschen sie zunächst in PBS mit 0.25% Trypsin und suspendieren es dann in Eagle's Minimal Essential Medium, dem 10% Kälberserum, Aminosäuren und Na-myruvat zugesetzt ist. Der pH des Mediums schwankt zwischen 6.8 und 7.0. Die Bebrütungstemperatur beträgt 31°C.

Auf der Deckglasoberfläche bilden fibrozytenartige Zellen und vereinzelt Spermatiden zunächst ein loses Netzwerk und später einen dichten Zellrasen. Den Autoren gelingt eine weitere Differenzierung der Monolayer mit lichtoptischen Methoden nicht. Im Medium suspendiert finden sie in den Kulturen der adulten Rattenhoden alle Stadien der Spermiogenese vertreten. Während in 3-4 Wochen alten und älteren Kulturen Spermatogonien und Spermiozyten noch vorhanden sind, sind alle anderen Keimzellformen zu diesem Zeitpunkt bereits vollkommen degeneriert.

Die im Medium der Zellkulturen nicht adulter Rattenhoden angetroffenen Keimzellen entsprechen dem Reifegrad der jeweiligen Versuchstiere. Während der Kultivierung findet eine Weiterentwicklung der in Kultur gebrachten Keimzellen nicht statt.

Die Verfasser kommen zu dem Ergebnis, daß eine Differenzierung der Zellen der Monolayer nur durch histochemische oder elektronenoptische Untersuchungen möglich ist. Im Gegensatz zu JORDAN-KATSH und de STACKELBURG schließen sie eine Spermiogenese in vitro aus.

STEINBERGER, STEINBERGER und VILAR (1966) untersuchen in einer weitergehenden Arbeit die Monolayer einer Rattenhodenzellkultur mit histochemischen Methoden.

NIEMI und IKONEN (1961) weisen in den Leydigzellen von Rattenhoden das Enzym β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase nach, das für die Steroidsynthese dieser Zellen von großer Bedeutung ist. Mit Hilfe dieses Enzymes versuchen STEINBERGER, STEINBERGER und VILAR (1966) die Leydigzellen einer Hodenzellkultur zu identifizieren. Um einen möglichst großen Anteil von Leydigzellen zu kultivieren, behandeln sie einige Ratten vorher mit menschlichem Chorion-Gonadotropin (HCG), wodurch das Wachstum der interstitiellen Zellen stimuliert wird. Andere Ratten bleiben unbehandelt.

Die Monolayerzellen sowohl der behandelten als auch die der nicht behandelten Ratten weisen lichtoptisch keine Unterschiede auf. Die Zellkulturen der behandelten Ratten weisen wesentlich mehr Enzym-positive Zellen auf als die der unbehandelten. Diese werden von den Autoren wie folgt beschrieben: Sie besitzen eine spindlige Form mit teilweise langen zytoplasmatischen Ausläufern. Ihr Kern enthält 1-4 Nukleoli unterschiedlicher Größe. VILAR, STEINBERGER und STEINBERGER (1966) führen auch elektronenoptische Untersuchungen an denselben Rattenhodenzellkulturen durch.

Es gelingt ihnen auf diese Weise, Fibroblasten von den Leydigzellen zu unterscheiden, andere Zellen: Sertolizellen und Spermatogonien finden sie im Monolayer nicht. Sie beschreiben die Fibroblasten wie folgt: Sie besitzen einen unregelmäßig gefalteten Kern, das Karyoplasma ist, abgesehen von einigen kleineren Kernplasmaklumpen, die an der Kernmembran haften, einheitlich granuliert, es ist nur 1 Nukleolus vorhanden. Im Zytoplasma befinden sich unregelmäßig verteilte, teilweise auch erweiterte Zisternen, daneben kleinere Vesikel, ein nur schwach ausgebildetes endoplasmatisches Retikulum mit einigen wenigen RNS-Granula. Schließlich sind im Zytoplasma noch feine Filamente und zahlreiche, nahe der Zellmembran gelegene, Einschlüsse zu finden.

Demgegenüber erscheinen die Leydigzellen im Elektronenmikroskop als große Zellen mit homogenem, runden bis ovoiden Nukleolus, 1-3 Nukleoli und zahlreichen Fetteinschlüssen im Zytoplasma.

Der Golgiapparat ist gut entwickelt, die Zellgrenzen sind glatt, an diesen fallen hier und da noch Reste der Mikrovilli auf.

KODANI und KODANI (1966) bringen Hoden von Bullen, Kaninchen und Mäusen in Kultur. Sie verwendeten modifiziertes Eagle's Medium, das mit Kälberserum im Verhältnis 2:3 und Antibiotika angereichert war. Die optimale Bebrütungstemperatur lag bei 34-35°C. Es gelingt ihnen, mittels zweier von ihnen entwickelter und als Free-cell- und Tubulimethode bezeichneter Arbeitsvorgänge, Sertolizellen in Reinkultur zu züchten. Sie beschreiben die Sertolizelle als eine epitheliale Zelle mit einem deutlichen Nukleolus, heterochromatischen Granula unterschiedlicher Form und Größe und nukleären Karyosomen. Als für Sertolizellen kennzeichnend werten die Autoren das Auftreten von Kernfalten.

Schließlich stellen sie im Zytoplasma noch zahlreiche Einschlüsse fest, die sich durch fettlösende Mittel extrahieren lassen. In jungen Kulturen wachsen die Sertolizellen noch in ihrem Zellverband und weisen die oben beschriebene typische Form auf, - später verlassen sie diesen, um in die Umgebung auszuwandern; sie ernahlen dann das Aussehen amöboid beweglicher Zellen, die zur Phago- und Pinocytose befähigt sind.

EVEREV, ZIVKOV und RUSSEV (1970) kultivieren nach der bei KODANI u. KODANI (1966) angegebenen Methode Hoden geschlechtsreifer und nicht geschlechtsreifer Menschen. Die LDH-X-Fraktion, die spezifisch für menschliche Spermien sein soll, ist in den Zellen der Monolayerkultur, die vorwiegend aus Sertolizellen besteht, nicht nachweisbar.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material und Methodik

Es wurden 53 Kälberhoden untersucht, davon entfielen 21 auf fetale und 32 auf postnatale bovine Gonaden. Von jedem Tier wurde ein Hoden in die Gewebekultur gebracht, der zweite histologisch verarbeitet. Insgesamt mehr als 200 Deckglaskulturen wurden hergestellt und ausgewertet. Die Feten stammten von Schlachtkühen im Schlachthof Frankfurt am Main^{x)}, die postnatalen Gonaden vom Gießener Schlachthof.^{x)}

Das Untersuchungsmaterial wurde in 6 verschiedene Altersgruppen unterteilt. Das Alter der Feten wurde an Hand der bei ZIETSCHMANN-KRÖLLING (1955) angeführten Altersbestimmungstabelle für Rinderfeten bestimmt, das der postnatalen Kälber nach der Altersbestimmungstabelle für Rinder bei HABERMEHL (1967).

Die Methodik läßt sich in vier Arbeitsabschnitte untergliedern: Materialgewinnung, Aufarbeitung, Subkultivierung und weitere Verarbeitung.

1. Materialgewinnung:

Die Feten werden etwa 20 Minuten nach der Tötung des Muttertieres möglichst keimfrei aus dem Uterus entnommen. Je nach Alter des Tieres wird die Gonade entweder aus der Bauchhöhle oder aus dem Skrotum steril entnommen und sofort in gekühltes (ca. 4°C) Medium (TC-199 mit Earle'scher Salzlösung und Antibiotika ohne Serum) verbracht.

Die Weiterverarbeitung erfolgt in der Regel nach 2-3 Stunden, die das Material enthaltenden Glasflaschen mit Medium werden inzwischen auf Eis gehalten.

Bei den Kälbern werden die Hoden mit dem Skrotum unmittelbar nach Schlachtung und Entbluten abgebunden und in ein Gefäß mit Eis gelegt.

Die Weiterverarbeitung erfolgt nach 1/2 bis 1 Stunde.

x) Für die freundliche Unterstützung bei der Materialgewinnung möchten wir uns bei den Schlachthofdirektoren der Schlacht- und Viehhöfe Frankfurt am Main und Gießen herzlich bedanken.

2. Aufarbeitung:

Je nach Größe der Hoden werden sie vor der Kultivierung entweder mechanisch zerkleinert und ausgestrichen oder aber zerkleinert und trypsiniert. Letzteres wird bei allen postnatalen und bei allen fetalen männlichen Gonaden ab einer Größe von ca. 3x1 cm durchgeführt.

a) Ausstrichmethode (Direktmethode):

Von den fetalen Gonaden wird unter sterilen Bedingungen die Tunica albuginea soweit wie möglich entfernt, das restliche Gewebe mit einer kleinen gebogenen Schere fein zerschnitten. Das so zerkleinerte Material wird mit einem Spatel am Boden einer Vierkantflasche (200 ml) gleichmäßig verteilt, verschlossen und für etwa 10-15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach überschichtet man die Gewebspartikel mit etwa 10-12 ml Medium, begast die Flasche mit CO₂-Luftgemisch (5% CO₂) und stellt sie vorsichtig, ohne Erschütterung, in den Brutschrank (37°C). Nach 2-5 Tagen beginnen die Zellen in der Regel aus den eingebrachten Gewebspartikeln auszuwachsen, nach 8-14 Tagen, unter Umständen auch erst nach 3 Wochen, ist der Flaschenboden von einer Zellschicht bedeckt, so daß Subkulturen angelegt werden können.

b) Trypsinierung:

Die durch das Verfahren der Trypsinierung gewonnenen Kulturen zeigen im allgemeinen ein schnelleres und gleichmäßigeres Wachstum. Voraussetzung dafür ist allerdings, daß genügend Ausgangsmaterial zur Verfügung steht.

Nach der sterilen Entnahme des Hodens aus dem Skrotum werden nach Möglichkeit alle bindegewebigen Anteile (Tunica albuginea, Rete testis und Interstitium) entfernt, das restliche Gewebe mit der Schere in ca. 1x2x2 mm große Stückchen geschnitten. Diese wäscht man 2-3mal mit einer gepufferten Balzlösung (BS-Phosphat Buffered Solution mit 0.25% Trypsin-Difco und Antibioticis). Mittels eines Magnetrührers werden die Gewebsteilchen in dieser Trypsinlösung etwa 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der Überstand mit den herausgelösten Zellen und kleinen Zellverbänden wird bei 800-1000 UpM 5 Minuten lang zentrifugiert und die am

Boden des Zentrifugengläschens liegenden Zellen zweimal in PBS gewaschen. Schließlich suspendiert man diese Zellen in Medium und stellt auf ca. 300 000 Zellen pro ml Medium ein. In jede Vierkantflasche werden 10-12 ml Medium gebracht, die Flaschen in den Brutschrank gestellt und in den nächsten 24 Stunden nicht mehr bewegt. Im Durchschnitt entwickelt sich nach 6-8 Tagen ein dichter Zellrasen, von dem Subkulturen angelegt werden können.

Für die fetalen Gonaden wird TC-199 mit Earle's BSS und Glutamin (Serva) verwendet, dem 20% fetales Kälberserum, Penicillin und Streptomycin zugesetzt werden. Die postnatalen Hoden hingegen werden mit Mc.Coys 5a Medium (modifiziert, Grand Island Biological Company) mit den gleichen Zusätzen kultiviert.

Der pH wird gleichmäßig auf 7.0 eingestellt, die Flaschen vor Verschuß mit 5% CO₂-Luftgemisch begast. Das Medium wird alle 3-5 Tage, je nach Verbrauch gewechselt. Der Verbrauch zeigt sich in einer Säuerung (Verfärbung ins Gelbe) an.

3. Subkulturen:

Wenn der Zellrasen sich geschlossen hat, werden Subkulturen angelegt. Man gießt das Medium ab, ersetzt es durch 2.0 ml PBS-T und gießt diese wiederum nach 2 Minuten ab. Danach werden die Kulturen mit 1-2 ml PBS-T überschichtet, die Zellen sollen sich nach etwa 20-30 Minuten im Brutschrank gelöst haben. Die Flaschen werden nun mit frischem Medium ausgespült und die Zellen in Medium resuspendiert. Das Trypsin wird durch das im Medium enthaltene Kälberserum inaktiviert, ein weiterer Waschprozeß mit Zentrifugation entfällt dadurch (ULBRICH, 1966).

Das zellhaltige Medium verteilt man jetzt auf Kulturflaschen mit Deckgläsern (Typ Leighton, 2.0 ml Medium pro Flasche) oder auf Vierkantflaschen, auf deren Boden Deckgläser liegen. Nach 1-6 Tagen entnehmen wir die Deckgläser mit den darauf befindlichen Kulturen und bearbeiten sie weiter.

4. Weitere Verarbeitung:

Die mit Zellen bewachsenen Deckgläser werden in Davidson, gepuffertem Formalin, kühl gepuffertem Formalin, Carnoy oder Methanol/Eisessig fixiert und HE, Gömöri/HE Giemsa, Feulgen/Lichtgrün, van Gieson oder Fettrot gefärbt.

Es wird einmal das allgemeine Zellwachstum beurteilt, dann aber auch der prozentuale Anteil der epithel- und fibroblastenartigen Zellen und deren Mitoserate annähernd bestimmt. Zur genaueren Erfassung der Keimzellen wird jede Subkultur mit dem 10er Objektiv einmal längs durchmustert und die dabei auftretenden Keimzellen gezählt, sowie ihr prozentualer Anteil am Gesamtwachstum bestimmt. Gleichzeitig wird auch die Mitoserate errechnet.

Die zur histologischen Untersuchung gelangenden Hoden werden in Davidson oder gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Es werden 5/ μ dicke Schnitte angefertigt und HE, Gomorri/HE und Feulgen/Lichtgrün gefärbt.

Um Aufschluß über die jeweilige Entwicklungsphase der Gonaden, besonders hinsichtlich der Keimzellentwicklung, zu erhalten, und um zu erfahren, welche Zellen in Kultur gebracht wurden, haben wir zur Kontrolle der Gewebekultur die Hoden auch histologisch untersucht. Dabei wird vor allem die Zahl der BIS-Zellen und der Samenmutterzellen pro Hodentubulus ermittelt. Dazu werden 10 gleich große Tubuli ausgesucht und deren BIS- und Samenmutterzellen gezählt und daraus die durchschnittliche Anzahl beider Zellen pro Hodenkanälchen bestimmt. Dies wurde bislang nur bei postnatalen Hoden von ABDEL-RAOUF (1960) durchgeführt.

2. Zellen der Gewebekultur fetaler und postnataler Kälberhoden - eine kurze morphologische Charakterisierung

In der Gewebekultur fetaler und postembryonaler Kälberhoden wird das Zellbild im wesentlichen von vier verschiedenen Zellarten geprägt: den keimzellartigen, den fibroblastenartigen, den epitheloiden und den nicht näher differenzierbaren Zellen.

Um im weiteren Verlauf unserer eigenen Untersuchungen Wiederholungen zu vermeiden, soll eine kurze morphologische Charakterisierung dieser eben erwähnten Zelltypen vorangestellt werden.

Als Kriterien dieser Zelldifferenzierung werden Form und Gestalt von Zellkern und Zelleib und deren Verhalten bei verschiedenen Färbungen herangezogen.

1. Fibroblastenartige Zellen: (Abb.9,10,11,12,13,14,15,16)

In allen Gewebekulturen bilden die Fibroblasten bzw. die Fibroblasten ähnlichen Zellen den größten Teil der Zellen. Deshalb sollen sie zuerst beschrieben werden. Es handelt sich bei diesem Zelltyp um Zellen mit einem länglichen bis ovalen, oft auch spindel- oder eiförmigen Kern, der von einem in der Regel länglichen Zelleib umgeben ist, in dem sich sehr häufig runde bis polyedrische, unregelmäßig im Zellplasma verteilte Einschlüsse befinden. Innerhalb einer Deckglaskultur, besonders aber innerhalb einer mehrere Tage umfassenden Kulturreihe, weisen die Kerne erhebliche Größenunterschiede auf; neben kleineren $15 \times 10 \mu$ großen Kernen findet man auch solche, die $40 \times 30 \mu$ groß sind.

In jüngeren Kulturen ist dieser langgestreckt mit längeren protoplasmatischen Fortsätzen an den gegenüberliegenden Seiten des Zellkörpers. Es hat den Anschein, als suchten sie damit gleichsam mit benachbarten Zellen in Kontakt zu treten. Dadurch bekommt das gesamte Zellbild ein waben- oder spinnwebenartiges Aussehen. Daneben kann der Zelleib aber auch eine dreieckige Form haben. Dies trifft besonders für einzelliegende Zellen dieses Zelltyps zu sowie für Zellen mit einem sehr großen Kern. In einer sehr dichten Fibroblastenkultur herrschen die langgestreckten Zellkörper vor, die dicht nebeneinander liegen und ein mehr strangförmiges Wachstum zeigen.

Im Zelleib dieser Zellen befinden sich häufig zahlreiche fettnegative Vakuolen, die ihm ein granuliertes Aussehen verleihen.

2. Epithelartige Zellen: (Abb.9,10,11,15)

Eine weitere, in der Zellkultur auftretende Zellart ist die epithelartige oder epitheloide Zelle. Sie ist durch einen runden Kern und einen polygonalen Zelleib gekennzeichnet. Meist liegen sie einzeln zwischen den fibroblastenartigen Zellen, so daß sie nur schwer zu erkennen sind. In Gewebekulturen postnataler Kälberhoden hingegen bilden die epitheloiden Zellen teilweise plattenartige Zellverbände. Häufig bestehen solche Zellnester aus Zellen mit konstanter Kerngröße, die im Durchschnitt $10-16 \mu$ beträgt, einer sehr scharf gezeichneten Kernmembran und einem fein granulierten Kernplasma, in dem sich meist 1-2 Nukleoli be-

finden. Der Zelleib ist polygonal. Seine Zellgrenzen sind nicht klar erkennbar. Auch im Zelleib der epithelialen Zellen befinden sich häufig zahlreiche fettnegative Vakuolen.

Zwischen den epithelartigen und fibroblastenartigen Zellen treten in jeder Kultur Übergangsformen auf, deren Zugehörigkeit nicht sicher zu klären ist. Die Kerne sind weder rund noch oval, noch spindelförmig: sie machen einen plumpen und unförmigen Eindruck. Auch die Form des Zelleibes kann recht unterschiedlich sein, denn auch sie schwankt oft zwischen polygonal und länglich.

3. Keimzellen: (Abb.11,15,16,17,18)

Die dritte Zellart in der Gewebekultur fetaler wie postnataler Kälberhoden sind die Keimzellen. Sie unterscheiden sich sowohl in Form und Gestalt, als auch in ihrem Verhalten gegenüber verschiedenen Färbungen erheblich von den oben beschriebenen Zelltypen. In der Ruhepause sind es runde, einzeln gelegene Zellen, mit einem in der Regel runden, manchmal aber auch ovalen, zentral oder peripher gelegenen Kern, dessen Durchmesser 8-9 μ beträgt, während die gesamte Zelle im Ruhestadium 13.4 μ mißt. Im Nukleus befindet sich meist ein Kernkörperchen. Das Chromatin ist staubkornartig in ihm verteilt. Die Kernmembran ist immer sehr deutlich gekennzeichnet. Außen ist der Kern von einem schmalen Zytoplasmasaum umgeben, der eine heller aufleuchtende Randzone aufweist.

Eine weitere Besonderheit, durch die sich die Keimzellen von den übrigen Zellen unterscheiden, zeigt sich in ihrem Verhalten bei verschiedenen Färbungen:

Es fällt auf, daß sie sich wesentlich intensiver anfärben lassen als die epithel- und fibroblastenartigen Zellen, so daß schon bei einfacher Vergrößerung zwischen den Keimzellen einerseits und den epithel- und fibroblastenähnlichen Zellen andererseits differenziert werden kann. Diese Erscheinung beruht auf einer im Vergleich zu den übrigen Zellen höheren Dichte des Kernchromatins und des Zellzytoplasmas (siehe Tabelle IV).

Befindet sich die Keimzelle in Mitose, - wie dies sehr häufig der Fall ist, - so läßt sie sich nicht mehr auf die oben beschriebene Form festlegen; sie kann dann sehr polymorph sein.

Wie bei den jüngeren fibroblastenartigen Zellen bilden sich oft kurze protoplasmatische Ausläufer, zwischen denen der mittlere spindelförmige Zellkörper hängt. Eine heller aufleuchtende Randzone ist meist nicht mehr feststellbar. Allein ihre bereits beschriebene intensivere Anfärbbarkeit ist das einzige Merkmal, durch welches sie sich eindeutig von den übrigen Zellen der Kultur auch in diesem Zustand differenzieren lassen.

4. Nicht näher differenzierbare Zellen:

Neben den 3 eben aufgezeigten Zelltypen treten in jeder Kultur noch Zellen auf, deren Zugehörigkeit nicht sicher zu klären ist. Es handelt sich dabei einmal um die bereits erwähnten Zellen, deren Kerne weder rund noch oval noch spindelförmig sind und die einen eher plumpen und unförmigen Eindruck machen, und die als Übergangsformen zwischen den epithelartigen und fibroblastenartigen Zellen interpretiert werden.

Daneben werden aber ferner noch sehr kleine Kerne in unterschiedlicher Menge gefunden, die sich in der HE und Feulgen-Färbung intensiv rot, in der Giemsa-Färbung kräftig blau anfärben. Ein Zelleib fehlt solchen Zellen meist; ist er vorhanden, so sind seine Grenzen unklar und verwischt. Solche Zellen stellen verschieden weit fortgeschrittene Degenerationsformen einer der drei oben beschriebenen Zelltypen dar.

Tabelle IV:

Form und Gestalt

der in Hodenkulturen auftretenden Zellen

Zellart	Kern	Zelleib
im Ruhestadium: Keimzelle:	rund bis oval, zentral oder peripher gelegen mit einem Nukleolus, das Chromatin entweder gleichmäßig im Kern verteilt oder krustenartig der meist sehr deutlich gezeichneten Kernmembran aufsitzend. Durchmesser: 8-9 μ .	ein schmaler, den Kern ringförmig umgebender Zytoplasmasaum, der eine heller aufleuchtende Randzone aufweist. Im Gegensatz zu den Zelleibern, der übrigen Monolayerzellen ist er stets intensiver gefärbt. Größe: 13,4 μ .
in Mitose:	Der Kern weist eine der Mitosephase der Zelle entsprechende Teilfigur auf.	Zelleib sehr polymorph, er kann runde, ovale, längliche und sogar spindlige Form annehmen, die heller aufleuchtende Randzone fehlt in der Regel. Auffärbbarkeit s.o.
fibroblasten- artige Zellen:	länglich-oval, spindel- bis eiförmig, Kernplasma feingranuliert mit mehreren Nukleoli. Größe: alle Kerne 15x10 μ - 40x30 μ .	länglich, bei einzeln liegenden Zellen manchmal auch dreieckig. zahlreiche runde bis polyedrische Einschlüsse im Zelleib.
epithelartige Zellen:	rund, feingranuliert, mit unterschiedlich vielen Nukleoli. Durchmesser: 10-16 μ .	polygonal, mit zahlreichen vakuoligen Einschlüssen.

Tabelle V:

Verhalten der verschiedenen Zellen
bei unterschiedlicher Färbung

Färbungen	Keimzelle		Epithelzelle		Fibroblasten	
	Kern	Zelleib	Kern	Zelleib	Kern	Zelleib
HE	Kernpl., Chromatin, bläulich rot	dunkelrot mit hel- lem Rand	grau-rot mit bläu- lich-rotem Chromatin	rötlich	wie Epithelzelle	
Gömöri/HE	Chromatin dunkel schwarz- rot	dunkelrot mit hel- lem Rand	braun-grau mit schw. Chromatin	hell grau-braun	wie Epithelzelle	
Giemsa	Chromatin tintenblau Kernpl.hel- ler blau- rötlich	blau bis rötlich blau m.he.Rd.	hell blau blaues Chromatin	bläulich- rot	wie Epithelzelle	
Feulgen/ Lichtgr.	Chromatin leuchtend rot, Kernpl. farblos	grün mit hellem Rand.	rötlich	grüner Schimmer	wie Epithelzelle	
v.Gieson	Chromatin schw.	ocker- farben heller Rand	rot- gelblich	rot-gelb	wie Epithelzelle	

5. Auswertung der eigenen Untersuchungen

5.1 Einteilung des fetalen Untersuchungsmaterials nach SSL und Alter

A) Fetale Hoden:

I. Gruppe:

6-15 cm SSL (7.-8.Wo)	6.0 cm (7.Wo)	Fall 13
	9.5 cm (9.-10.Wo.)	Fall 8
	10.5 cm (10.Wo.)	Fall 1
	14.0 cm (11.-12.Wo.)	Fall 9
	15.0 cm (12.Wo.)	Fall 22

II. Gruppe:

15-36 cm SSL (12.-20.Wo.)	18.0 cm (14.-15.Wo.)	Fall 26
	18.0 cm (14.-15.Wo.)	Fall 27
	20.0 cm (15.Wo.)	Fall 14
	20.0 cm (15.Wo.)	Fall 15
	22.0 cm (15.-16.Wo.)	Fall 28
	25.0 cm (16.-17.Wo.)	Fall 29
	26.0 cm (17.Wo.)	Fall 2
	30.0 cm (18.-19.Wo.)	Fall 25
	30.0 cm (18.-19.Wo.)	Fall 30
	35.0 cm (20.Wo.)	Fall 7
	36.0 cm (20.Wo.)	Fall 17

III. Gruppe:

36-60 cm SSL (20.-28.Wo.)	40.0 cm (21.-22.Wo.)	Fall 6
	45.0 cm (22.-23.Wo.)	Fall 20
	45.0 cm (22.-23.Wo.)	Fall 21

IV. Gruppe:

60-90 cm SSL (28.Wo.-Geb.)	80.0 cm (40.Wo.)	Fall 12
	90.0 cm (geburtsreif)	Fall 24

Gruppe I: SSL: 6-15 cm (10.-12.Woche) 5 Fälle (Abb.1,2)

Histologie: Der kleinste, in diese Gruppe gehörende Fetus hatte eine SSL von 6 cm, der größte eine SSL von 15 cm.

Wie bereits bei der Besprechung der vorliegenden Literatur angeführt, findet die Geschlechtsdifferenzierung bei einer SSL von ca.3 cm statt, so daß also bei der Gonade des 6 cm langen Fetus eindeutig von einem Hoden gesprochen werden kann. In ihm sind bereits alle die Zellelemente angelegt, die wir bei den männlichen Gonaden späterer Entwicklungsstadien auch finden; lediglich deren Lage und Größe, sowie die Verteilung der Zellen im Hoden erfahren eine Veränderung.

Die Gonade des 6 cm langen männlichen Fetus ist 4x1.5 mm groß und liegt noch medial zur Urniere, während sie bei 15 cm SSL bereits vor dem Beckeneingang liegt und etwa Linsengröße hat. Beim 6 cm großen Fetus ist noch eine dünne, einschichtige, aus Coelomzellen bestehende Keimepithelschicht vorhanden. Gleich darunter aber folgt schon die gut ausgebildete sekundäre Tunica albuginea, die zunächst allerdings noch aus locker aneinander gelagerten Fasern besteht. Eine Trennung in Tunica fibrosa und Tunica vasorum ist noch nicht durchgeführt, jedoch bereits im 9.5 cm-Stadium läßt sich diese Zweischichtigkeit erkennen, - auch ist hier die einzellige Keimepithelschicht vollständig reduziert.

Unter der Tunica albuginea folgt die Zone der primären Keimstränge. Bei einer SSL von 6 cm handelt es sich dabei noch um solide Zellzapfen, die fast nur aus Coelomepithelzellen und Gonozyten bestehen. Jeder dieser Keimstränge besitzt an der Außenseite eine zunächst noch sehr dünne Basalmembran, die Tunica propria. Die Zellen der Hodenstränge liegen hier noch regellos dicht beieinander; aber bereits bei 9.5 cm SSL und vor allem im 15 cm-Stadium hat sich dieses Bild vollkommen geändert: aus den soliden Zellzapfen sind (fetale) Tubuli geworden, auf einer inzwischen ausgeprägteren Basalmembran haben sich die Coelomzellen aufgereiht; man sieht von ihnen allerdings nur ihre runden, vereinzelt auch ovalen Kerne, - Zellgrenzen sind nicht mehr erkennbar. Diese Zellen werden nun auch BIS-Zellen oder undiffe-

renzierte Hodenzellen genannt. Die Zahl dieser Zellen variiert innerhalb der Gruppe I zwischen 14 und 18 Zellen pro Tubuli. Da die undifferenzierten Hodenzellen nun an die Peripherie der Keimstränge gerückt sind, hat sich in den primären Hodensträngen ein zunächst noch mit einer strukturlosen Substanz ausgefülltes zentrales Lumen gebildet. Darin liegen die Gonozyten, die sich, wie schon beschrieben, durch ihre Größe und ihr Aussehen von den übrigen Zellen der Tubuli unterscheiden. Meist liegen sie in dieser Gruppe noch axial, einige aber auch schon basal zwischen den Bis-Zellen. Es scheint allerdings, daß diese Zellen sehr bald degenerieren. Im Durchschnitt befinden sich 3-4 Gonozyten in einem Tubulus.

Zwischen den fetalen Hodenkanälchen füllt intertubuläres, noch nicht näher differenziertes Bindegewebe den Raum aus, die Keimstränge liegen dicht beieinander und berühren sich, im 9.5 cm-Stadium allerdings hat es bereits stark zugenommen; die Hodentubuli werden durch ein sehr kernreiches Gewebe weit voneinander getrennt. Bereits im 6 cm-Stadium erscheint es an manchen Stellen strukturiert, um die meist runden Kerne sind polygonale Zellgrenzen erkennbar, so daß diese Zellen als Leydigzellen angesprochen werden können, daneben sind auch sehr viele Fibrozyten vorhanden.

Im Zentrum befindet sich das Rete testis, durch seinen höheren Fasergehalt erscheint es bei allen Färbungen heller. Die fetalen Hodentubuli stehen mit diesen noch nicht in Verbindung; bei einem Fetus (Fall Nr.8 SSL 9.5 cm) ist es bereits kanalisiert.

Gewebekultur: Zu allen in Gruppe I histologisch untersuchten Hoden wurden Gewebekulturen angelegt. Von den Subkulturen wurde eine bis zum 3., eine bis zum 4., zwei bis zum 7. und eine bis zum 11.Tag gezüchtet. In den Deckglaskulturen treten die eingangs beschriebenen Zellarten in recht unterschiedlicher Verteilung auf. In allen Fällen wird das Zellbild von den Fibrozyten bestimmt: sie stellen mit 80-85% den größten Zellanteil dar. Vor allem in Subkulturen vom 7. und 11.Tag liegt eine fast nur aus fibrozytenartigen Zellen bestehende Kultur vor. Epitheloide Zellen sind nur in jüngeren Subkulturen zu finden - etwa 4-5%

aller Zellen. In älteren Kulturen sind sie vollkommen verschwunden.

In den Zellkörpern beider Zellarten sind sowohl in jungen, als auch in alten Kulturen viele runde bis polyedrische Einschlüsse zu sehen, ohne daß der Zellkern irgendwelche Veränderungen aufgewiesen hätte. Keimzellen treten in allen Subkulturen in sehr unterschiedlicher Anzahl auf, so sind sie z.B. in einigen sehr jungen Kulturen nur mit 1-2% vertreten, während sie andererseits in Subkulturen des 7. und 11. Tages 5-10% aller Zellen ausmachen. Auffallend ist ihre hohe mitotische Aktivität, in allen Kulturen befinden sich bis zu $\frac{3}{4}$ der Keimzellen in Mitose und nur ein ganz geringer Prozentsatz in der Ruhephase. Bei den fibroblasten- und epithelartigen Zellen hingegen liegt eine ausgesprochen niedrige Mitoseaktivität vor, sie umfaßte 0.25-0.5%.

In älteren Subkulturen zeigen viele Keimzellen Degenerationserscheinungen in Form von Chromatinverklumpung und Eosinophilie des Zellplasmas.

Das Wachstum der Zellkulturen der Gruppe I ist durchschnittlich als gut zu bezeichnen.

Zusammenfassend läßt sich zu der Gewebekultur dieser Gruppe I feststellen:

1. Fibrozytenartige Zellen beherrschen das Zellbild, ihr Anteil beträgt 80-85%.
2. Epitheloide Zellen sind nur in jungen Subkulturen mit 4-5% vorhanden.
3. Die Mitoseaktivität bei den epitheloiden und fibrozytenartigen Zellen ist sehr gering, sie umfaßt 0,25-0,5%.
4. In allen Zelleibern der fibrozyten- und epithelzellartigen Zellen treten vakuolige Einschlüsse auf, ohne daß der Kern degenerative Veränderungen zeigt.
5. Keimzellen können sowohl in ganz jungen (S_1 :1.Tag), als auch in sehr alten Subkulturen auftreten (S_1 :11.Tag).
6. Meist sind 5-10% Keimzellen vorhanden, von denen sich $\frac{3}{4}$ und mehr in Mitose befinden.
7. Das Zellwachstum der Subkulturen der Gruppe I ist im Durchschnitt gut.

- siehe Tabelle VI -

Fetale Kälberhoden, SSL 6-15 cm (7.-8. Mo), 5 Fälle

Fall nr.	S ₁ : 1. Tg	S ₁ : 2. Tg	S ₁ : 3. Tg	S ₁ : 4. Tg	S ₁ : 5. Tg	S ₁ : 6. Tg	S ₁ : 7. Tg
13/69 6cm SSL	N: ++; F: 65%, E: 10%, Kz: 5%, davon die Hälfte in Ruhe- stadium.	N: ++; F: 90-95%, E: 2-3%, Kz: 3-5%, alle in Mitose bei E. u. F. 0.5- 1% Mit. Zellein- schlusse, Fib. bilden längere Fortsätze	N: ++; F: 80%, E: 5%, Kz: 10-15%, alle in Mit. bei F. 5- 10%, 3/4 davon u. E. mit. aktiv. in Mitose. vaku- olige Zellein- schlusse. N: ++; F: 80-90%, E: 5-10%, Kz: 4-8%, alle in Mitose N: ++; F: 80-85%, E: 4-5%, Kz: 10-15%, alle in Mitose	N: ++; F: 90-95%, E: 5-10%, Kz: 1%			N: ++-+++; F: 70%, E: 5-10%, Kz: 0%
8/69 9.5cm SSL			N: ++; F: 90%, E: 5%, Kz: 5%, davon die Hälfte in Ruhe- stadium.	N: ++; F: 90-95%, E: 5-10%, Kz: 10- 15%, 2/3 in Mit. Zelleinschlüsse.			N: ++; F: 90-95%, E: 1-5%, Kz: 5%, davon 2-5% in Mit. F. oil- den längere Fasern.
9/69 14cm SSL		N: ++; F: 80-90%, E: 2-4%, Kz: 5-6%, alle in Mitose. N: ++; F: 80-90%, E: 2-4%, Kz: 0-8%, alle in Mitose.	N: ++; F: 85%, E: 3%, Kz: 7-8%, Kz. alle in Mit.	N: ++; F: 85-90%, E: 3%, Kz: 7-8%, Kz. alle in Mit.	N: ++-+++; F: 95%, E: 2-4%, Kz: 1%		S ₁ : 11. Tg N: ++; F: 80-85%, E: 5-6%, Kz: 10%.
22/70 15cm SSL	N: ++; F: 65-70%, E: 5-10%, Kz: 1-2%, al- le infolge Fixat- geschrumpt, den- noch Mitosefigur- gut zu erkennen (in allen)	N: ++; F: 85%, E: 1- 5%, Kz: 0-2%, 3/4 in Mitose.	N: ++; F: 85-90%, E: 5-10%, Kz: 1%. Einschlüsse in allen Zellen.	N: ++; F: 85-90%, E: 5-10%, Kz: 1%. Einschlüsse in allen Zellen.	N: ++; F: 90-95%, E: 2-4%, Kz: 1-5%, 2/3 in Mitose, Mit.aktivität bei E. u. F. äus- serst gering 1-1.5%.		
	N: Wachstum F: fibroblasten- haltige Zellen.	E: epithelartige Zellen Kz: Keimzellen	- = schlechtes W + = mäßiges W	++ = gutes W +++ = sehr gutes W, Subkultur dicht.			

Gruppe II: SSL: 15-36 cm (12.-20.Wo.) 11 Fälle (Abb.3,4)

Histologie: Der kleinste Fetus dieser Gruppe besaß eine SSL von 18 cm, der größte war 35 cm lang. Die Hodengröße variierte zwischen 1.0x0.5 cm bei 18 cm SSL und 1.5x0.6 cm bei 36 cm SSL. Im 15 cm-Stadium lag der Hoden noch vor dem Beckeneingang, am Ende des 36 cm-Stadiums hatte er teilweise bereits das Skrotum erreicht.

Kennzeichnend für alle männlichen Gonaden dieser Gruppe ist der hohe Anteil an intertubulärem Stroma, welches fast die Hälfte des gesamten Hodengewebes ausmacht. In diesem liegen die fetalen Hodentubuli willkürlich verteilt. Ihr Aufbau gleicht dem der Keimstränge der Gruppe I, - allerdings scheint die Tunica propria dicker geworden zu sein. Von außen haben sich ihr zahlreiche schmale Fibrozytenkerne angelagert; diese bilden mit ihren Zelleibern eine dünne, aus wenigen Fasern bestehende Schicht um die Basalmembran. Auf der Innenseite der Membrana propria befinden sich die BIS-Zellen, im Gegensatz zur willkürlichen Verteilung der Hodentubuli sind die BIS-Zellen regelmäßig angeordnet: mit ihrer Längsachse stehen sie senkrecht auf der Basalmembran, so daß sie an das Bild eines Palisadenzauns erinnern. Im 35 cm-Stadium fällt auf, daß sich bei einigen der undifferenzierten Hodenzellen der auf der Basalmembran gelegene Kernteil fußförmig verbreitert, während der gegenüberliegende Teil des Kernes spitz ausläuft. Die Zahl der BIS-Zellen dieser Gruppe schwankt zwischen 17 und 18 pro Tubulus. Die Zahl der Gonozyten hat sich vermehrt: sie beträgt 5-6 pro Hodenkanälchen. Sie liegen sowohl axial, als auch basal. Bei einigen Gonozyten fällt auf, daß ihre Kernmembran spitz- bis stumpfwinklige Falten und Einbuchtungen aufweist, bei manchen hat es sogar den Anschein, als ob ein Teil der Kernmembran überhaupt fehle. An verschiedenen Stellen ist die primäre Tunica albuginea bereits durchbrochen: Hodentubuli und Rete testis können nun miteinander in Kontakt treten. Teilweise besteht zwischen beiden schon eine offene kommunizierende Verbindung. Zwischen den Tubuli sind Leydigzellen erkennbar. Umgeben wird das gesamte Hodenparenchym von einer gut ausgebildeten zweischichtigen Tunica albuginea.

Gewebekultur. Die zu den Hoden der Gruppe II angelegten Subkulturen waren teilweise 7 Tage alt.

Ebenso wie in Gruppe I, haben auch hier die fibrozytenartigen Zellen den größten Zellanteil inne; er schwankt zwischen 70-85%. Dieser steigt mit zunehmendem Alter der Kultur noch an. Den geringsten Zellanteil mit durchschnittlich 4-5% nehmen die epithelartigen Zellen ein, wobei in jüngeren Subkulturen ihre Zahl größer ist als in älteren Kulturen. Bei beiden Zellarten ist die Mitoseaktivität mit ca.1% sehr gering. In den Zelleibern der epithel- wie auch der fibrozytenartigen Zellen befinden sich runde bis polyedrische Einschlüsse in unterschiedlicher Anzahl.

Die Keimzellzahl beträgt durchschnittlich 10-15%.

In einer 6 Tage alten Subkultur von Fall 29 (Fetus SSL: 25 cm) wird mit Fetteit gefärbt, um die für die Leydigzellen charakteristischen Fetteinschlüsse hervorzuheben. Es erweist sich, daß in etwa 1-2% aller Zellen kleine rote Fetteinschlüsse auftreten. Diese Zellen haben eine epitheloide Form; es könnte sich somit also um Leydigzellen handeln.

Das Wachstum der Subkulturen der Gruppe II war im Durchschnitt gut.

Zur Gewebekultur der Gruppe II läßt sich zusammenfassend folgendes feststellen:

- 1) Fibrozytenartige Zellen bestimmen das Zellbild der Subkulturen; ihr Anteil variiert zwischen 70-85%.
- 2) Epithelartige Zellen sind zu 4-5% vorhanden.
- 3) Bei beiden Zellarten übersteigt die Mitoseaktivität nicht 1%.
- 4) In epithel- und fibrozytenartigen Zelleibern befinden sich zahlreiche vakuolige Einschlüsse.
- 5) Der Anteil der Keimzellen innerhalb der Gruppe II ist hoch: er schwankt zwischen 10 und 15%.
- 6) Vakuolige Fetteinschlüsse werden in einigen epitheloiden Zellen einer Subkultur angetroffen, - bei diesen Zellen konnte es sich um Leydigzellen handeln.
- 7) In den Subkulturen der Gruppe II lag ein gutes Zellwachstum vor.

- siehe Tabelle VII -

Gruppe II: Tabelle VII

Fetale Kälberhoden; SSL: 15-36 cm (12.-20.Wo.) 11 Fälle

Fall nr.	S ₁ : 1.Tg	S ₁ : 2.Tg	S ₁ : 3.Tg	S ₁ : 4.Tg	S ₁ : 5.Tg	S ₁ : 6.Tg	S ₁ : 7.Tg
26/70 SSL: 18cm	W:++; F:95%, E:1-2%, Kz: 3-4% 50% d.Kz. in Mitose.		W:++; F:85%, E:1-5%, Kz:10%; 50% davon in Mi- tose, bei E.u.F. nur 1-2% Mit. F. bilden lange Aus- läufer.		W:++; F:90%, E:1-2%, Kz:7-8%, Hälfte davon in Mitose.		
27/70 SSL: 18cm		W:++; F:95%, E:0%, Kz:5%, die Hälfte davon in Mitose.	W:+++; F:70-75%, E:2-5%, Kz:20%, 3/4 Mitose, ein- ige in Degenera- tion..	W:+++; F:85%, E: 1-5%, Kz:10%. 2/3 a.Kz. degeneriert, 15% W:++; F:95%, E:1- 4%, Kz:1-5%, alle in Mitose.	W:++; F:80-85%, E:1-3%, Kz:10- 15%.		
15/70 SSL: 20cm	W:+++; F:95%, E:5%, Kz:0%.		siehe 1.Tag				
	W:++; F:95%, E:5% Kz:0%. Kz.mit kuhl gep.Form.	siehe 1.Tag					
14/70 SSL: 20cm			W:++; F:65-90%, E: 5%, Kz:5%; 3/4 in Mit. bei F.u.E. keine Mitose				
28/70 SSL: 23cm		W:++; F:85%, E:0%, Kz:15%, 3/4 u.mehr in Mitose.	W:++; F:80%, E:2-5%, Kz:10-15%, 3/4 in Mitose.		W:++; F:90-95%, E:1-2%, Kz:5%, 3/4 in Mitose.		
29/70 SSL: 25cm		W:++; F:85%, E:10% Kz:5%. Kz.113 2/3 in Mitose	W:++; F:90%, E:5-6% Kz:3-5%, 3/4 in Mitose.	W:++; F:85%, E:2- 5%, Kz:10%, 3/4 in Mitose.	W:+++; F:95%, E: 0%, Kz:4-5%.	W:++; F:85-90%, K.E., Kz:5-10%, 3/4 u.mehr in Mit; 1-2% aller Zellen kleine rote Fettinfil- trate.	

W=Wachstum E=epithelartige Zellen - schlechtes W ++ gutes W
F=fibrozytenartige Zellen Kz=Keimzellen + mäßiges W +++ sehr gutes W, Subkultur dicht

Gruppe II: Tabelle VII (Fortsetzung)

Fall Nr.	S ₁ : 1.Tg	S ₁ : 2.Tg	S ₁ : 3.Tg	S ₁ : 4.Tg	S ₁ : 5.Tg	S ₁ : 6.Tg	S ₁ : 7.Tg
2/69 SSL: 26cm			W:++;F:85%,E:3-5%, Kz:10%,viele (8%) in Ruhestadium. W:++;F:70-80%,E: 2-4%,Kz:15-20%,2/3 i.Mit. W:++;F:90%,E:5-10% Kz:2-3%,alle i.Mit. vak.Einschl.i.E u.F. W:++;F:95%,E:1-3%, Kz:1-2%,alle i.Mit. vak.Einschl.i.F u.E.		W:++;F:95%,E:2-3%, Kz:1-2%,alle in Mitose.		
25/70 SSL: 30cm	W:++;F:80%,E: 1-5%,Kz:10-15%, davon d.Hälfte Deg. 3/4 d.rest- lichen i.Mitose.		W:++;F:95%,E:0%,Kz: 5%, 3/4 in Mitose.	W:-;F:90-95%, E:1%,Kz:2-5%, d.Hälfte in Mitose.		W:++;alle Zel- len infolge Fix. u.kuhl gep.Form. geschrumpft.	
30/70 SSL: 30cm	W:++;F:85%,E:10-15%,Kz:5%, 3/4 in Mit., bei F.u. E:1% in Mitose.		W:++;F:75%,E:2-5%, Kz:10-15%,1/4 davon deg., 3/4 d.restl.i. Mitose.	W:++;F:95%, E:1%,Kz:4%, bei F.u.E.1%, im Ruhestadium.	W:-;F:95%,k.E., Kz:5%,Mehrzahl in Mit., diese	siehe 5.Tg.	
7/69 SSL: 35cm		W:++;F:85%,E:5-8%,Kz:5-6%, davon 3-4% i. Ruhe- stadium.	W:++;F:85%,E:5%, Kz:10%,d.Hälfte da- von i. Ruhestadium.				W:++;F:90%,E:3%, Kz:7-8%,3/4 i.Mit.
	W:++;F:80-90%, E:3-4%,Kz:5-6%, 2/3 in Mitose.						W:++;F:85%,E:2-3%, Kz:10-12%,2/3 und mehr in Mitose.
17/70 SSL: 35cm	W:++;F:85%,E: 5-8%,Kz:4-6%, 3/4 i.Mit.	W:-;F:95%,E:1-2%, Kz:2-3%,3/4 i.Mit. E.u.F.keine Mitose.	W:-;F:95%,E:1-2%, Kz:2-3%,3/4 i.Mit. E.u.F.keine Mitose.			W:-;F:95%, E:2-4%,Kz:0-1%.	

Gruppe III: 36-60 cm (20.-28.Wo.) 3 Fälle

Histologie: Der kleinste Fetus dieser Gruppe hatte eine SSL von 40 cm, der größte war 45 cm lang. In allen 3 Fällen befand sich der Hoden im Skrotum und war etwa 1,5x0,8 cm groß.

Im Vergleich zu den Hoden der Gruppe II treten, abgesehen von einer Umfangsvermehrung, keine signifikanten Veränderungen auf. Das intertubuläre Stroma scheint noch umfangreicher geworden zu sein: es ist mit runden und ovalen Kernen übersät, teilweise ist es noch unstrukturiert, an verschiedenen Stellen allerdings lassen sich Leydigzellen und Bindegewebszellen unterscheiden. Die Hodentubuli liegen in diesem interstitiellen Gewebe eingebettet; sie berühren sich nicht. An den Hodenkanälchen scheint die Tunica propria dicker geworden zu sein, außen haben sich dieser wieder (wie in Gruppe II) Fibrozyten angelagert; innen die BIS-Zellen, ca. 18-22 pro Tubulus. Diese liegen regelmäßig, palisadenzaunähnlich nebeneinander. CIS-Zellen sind nur in ganz vereinzelten Fällen anzutreffen. Die bislang unstrukturierte, homogene Substanz in den Tubulilumina hat sich teilweise streifenförmig verändert, so als würde an mehreren Stellen die Grundsubstanz gewissermaßen aufreißen. In diesen liegen die meisten Samenzellen, daneben trifft man sie vereinzelt auch auf der Basalmembran an. Einige Spermatogonien fallen durch ihre überdurchschnittliche Größe, andere wiederum durch die schon in der Gruppe II erwähnten Kernmembranveränderungen auf. Beides sind Kennzeichen einer ablaufenden Degeneration.

Im Zentrum folgt das Rete testis, es ist noch immer teilweise durch die primäre Tunica albuginea von den Hodentubuli getrennt. Das Hodenparenchym wird außen von einer sehr dicken sekundären Tunica albuginea umgeben, die aus einer 10-15schichtigen Tunica fibrosa und einer durch die prall gefüllten Blutgefäße ca. 2-2,5-mal so breit erscheinenden Tunica vasorum besteht.

Gewebekultur. Zu allen drei Hoden wurden Gewebekulturen angelegt, die davon erhaltenen Subkulturen waren bis zu drei Tage alt.

Hinsichtlich der Verteilung von fibroblasten- und epithelartigen Zellen gilt das gleiche wie schon in beiden vorherigen Gruppen: Die fibrozytenartigen Zellen sind in einigen jungen

und auch alten Kulturen bis zu 90% vertreten, die epitheloiden Zellen hingegen nur mit 2-5%. In den Zellen aller Deckglaskulturen treten die schon oft beschriebenen Einschlüsse auf. Die mitotische Aktivität dieser beiden Zellarten ist nicht größer als 1%.

Die Keimzellzahl weist eine auffallende Kontinuität mit durchschnittlich 5% auf, wobei die Mitoseaktivität wiederum sehr hoch ist: 2/3 aller Keimzellen befinden sich in Teilung. In den mit kühl gepuffertem Formalin fixierten Subkulturen sind die Keimzellen geschrumpft, trotzdem weisen sie immer noch die für die Keimzellen angegebenen Kriterien auf.

Das Wachstum war in allen untersuchten Kulturen nur mäßig bis gut, keine der Subkulturen wies einen dichten Zellrasen auf. Die Ursache dürfte in den Kulturbedingungen zu suchen sein.

Die Gewebekultur der Gruppe III kann wie folgt zusammengefaßt werden:

- 1) Die Verteilung von fibrozyten- und epithelartigen Zellen entspricht der der beiden bereits erwähnten Gruppen I und II: fibrozytenartige Zellen 90%, epitheloide Zellen 2-5%.
- 2) Die mitotische Aktivität dieser Zellen beträgt ca.1% und weniger.
- 3) In epithel- und fibrozytenartigen Zelleibern treten runde bis polyedrische Einschlüsse auf.
- 4) Der Anteil der Keimzellen in dieser Gruppe ist geringer als in der vorherigen: er beträgt ca.5%.
- 5) 2/3 aller Keimzellen befinden sich in Mitose.
- 6) In den mit kühl gepuffertem Formalin fixierten Subkulturen weisen zahlreiche Zellen Schrumpfungerscheinungen auf, hiervon sind besonders die Keimzellen betroffen.

- siehe Tabelle VIII -

Gruppe III: Tabelle VIII.

Fetale Kälberhoden, SSL: 56-60 cm (20.-28.Wo.) 3 Fälle

Fall Nr.	S ₁ : 1.Tg	S ₁ : 2.Tg	S ₁ : 3.Tg
6/69 SSL: 40 cm		W:++;F:65-70%,E:20-35%, Kz:1-2%, Kz: alle geschrumpft. W:++;F:80%,E:10-15%, Kz:5-10%.	W:++;F:90%,E:4-5%, Kz:2-5%,alle in Mitose.
21/70 SSL: 45 cm	W:++;F:90%,E:3-5%, Kz:5%, alle infolge Fixat.mit kühl gep.For- malin geschrumpft.	W:++-++;F:90%,E:3-5%, Kz:5%, alle geschrumpft,dennoch Mitosefiguren teilweise in ihnen erkennbar.	W:++;F:90%,E:3-5%, Kz:5%, 3/4 der Kz.in Mitose.
20/70 SSL: 45 cm	W:++;F:90%,E:5%,Kz:3-5%, wenig Mitosen in Kz.	W:+-;F:95%,E:2%, Kz:2-3%, alle geschrumpft. W:++;F:95%,E:3-5%,Kz: bis zu 5%,alle degeneriert.	W:+-;F:90%,E:3-4%,Kz: 5%,alle geschrumpft. Mitosefiguren in ihnen teilweise noch erkennbar.

Gruppe IV: 80-90 cm (28. Woche bis Geburt) 2 Fälle

Histologie. Die beiden in dieser Gruppe untersuchten Kälberhoden stammten von zwei Kälberfeten mit einer SSL von 80 und 90 cm; die Gonaden waren 2.5 x 1.2 cm groß und lagen im Skrotum.

Große Veränderungen zu den fetalen Hoden der Gruppen II und III fallen auch hier nicht auf, noch immer nimmt das intertubuläre Stroma den meisten Raum ein. In diesem liegen die weit voneinander getrennten Hodenkanälchen. Auch sie haben an Umfang zugenommen. An ihrem Aufbau hingegen hat sich nichts verändert: außen die (vielleicht etwas dickere) Tunica propria, der einerseits Fibrozyten anhaften, während ventralwärts Bis-Zellen palisadenartig auf der Basalmembran aufgereiht sind. Im Durchschnitt befinden sich 16-18 solcher undifferenzierter Hodenzellen in jedem fetalen Tubuli, daneben meist noch 1-2 Cis-Zellen. Die streifenförmige Struktur der Tubulilumina hat zugenommen und man hat den Eindruck, als ob kleine spaltförmige Hohlräume gebildet worden seien. Die Spermatogonien liegen sowohl axial, als auch basal zwischen den Bis-Zellen. Ihre Zahl ist gering: 2-3 pro Tubulus.

Im Hoden des 90 cm langen Fetus weisen verschiedene Spermatogonien Degenerationerscheinungen auf in Form von bereits in Gruppe II und III beschriebenen Kernmembrandefekten und Kernschwellungen.

Das rete testis ist sehr ausgeprägt; allerdings steht es noch nicht überall mit den Hodentubuli in Verbindung.

Gewebekultur. Der jeweils nicht zur Histologie verwandte Hoden dieser Gruppe wurde trypsiniert und in Kultur gebracht, die davon angelegten Suokulturen wurden bis zum 3. bzw. bis zum 4. Tag gezüchtet.

Für die fibrozyten- und epithelartigen Zellen dieser Kulturen gilt das gleiche, was bereits in den vorhergegangenen Gruppen gesagt wurde. Der Anteil der fibrozytenartigen Zellen schwankt zwischen 80 und 95%, der der epitheloiden Zellen beträgt ca. 5%. Ihre mitotische Aktivität beträgt 0,5-1%. In allen Zelleibern sind vakuolige bis polyedrische Einschlüsse zu sehen, die im

Zellkörper und um den Kern herum liegen. Der Anteil der Keimzellen variiert zwischen 0.5 (S_1 : 4.Tag, Fall 24) und 15% (S_1 : 3.Tag, Fall 12 und 24). $2/3$ der Keimzellen befinden sich in Mitose. Als Folge der Fixation mit kühl gepuffertem Formalin sind zahlreiche Keimzellen in nahezu allen Subkulturen dieser Gruppe geschrumpft, dennoch sind sie anhand der schon aufgezeigten Merkmale gut als Keimzellen zu erkennen.

Das Zellwachstum kann in den Subkulturen der Gruppe IV als gut bis mäßig bezeichnet werden.

Zusammenfassend läßt sich zu der Gewebekultur dieser Gruppe feststellen:

- 1) Fibroblasten- und epithelartige Zellen weisen das gleiche Verteilungsmuster auf wie in den Gruppen I, II und III: fibrozytenartige Zellen 80-95%, epitheloide Zellen ca. 5%.
- 2) Ihre mitotische Aktivität beträgt 0.5-1%.
- 3) In den meisten Zelleibern der fibroblastischen und epithelartigen Zellen treten vakuolige bis polyedrische Einschlüsse auf.
- 4) Der Anteil der Keimzellen schwankt zwischen 0,5 und 15%, $2/3$ der Keimzellen befinden sich in Mitose.
- 5) Durch Fixation mit kühl gepuffertem Formalin sind in allen Subkulturen zahlreiche Keimzellen geschrumpft.
- 6) Das Zellwachstum kann als gut bis mäßig bezeichnet werden.

- siehe Tabelle IX -

Gruppe IV: Tabelle IX

Fetale Kälberhoden, SS: 60-90 cm (28.Wo-Geburt) 2 Fälle

Fall Nr.	S ₁ : 1.Tg	S ₁ : 2.Tg	S ₁ : 3.Tg	S ₁ : 4.Tg	S ₁ : 5.Tg	S ₁ : 6.Tg	S ₁ : 7.Tg
12/70 80cm SSL	W:++;F:95%,E: 2-5%,Kz:1%,alle in Mitose.	W:++;F:80% mit längeren Aus- läufern,E:10- 15%,Kz:5%,da- von ca.80-90% in Mitose.	W:++;F:85%,E:5%, Kz:10%, 2/3 in Mitose.				
			W:+++;F:80%, E:5%,Kz:15%, 2/3 u.mehr in Mitose.				
24/70 90cm SSL	W:++;F:95%,E:2-4%, Kz:1-2%. Kz in- folge Fixation mit gep.Formalin geschrumpft.		W:+++;F:85%,K:E, Kz:10-15%,einige Kz(5-4%) degener. 3/4 in Mitose. Mitose bei E.u.F. 1% u.weniger.	W:++; F:95%, E:4-5%, Kz: 0.5%,alle Kz. weisen Mitose auf.			

W=Wachstum

F=fibrozytenartige Zellen

E=epithelartige Zellen

Kz=Keimzellen

- = schlechtes W

++ = gutes W

+ = mäßiges W

+++ = sehr gutes W, Subkultur dicht.

1.2 Einteilung des postnatalen Untersuchungsmaterials
nach SSL und Alter

B) Postnatale Hoden:

I. Gruppe:

Geburt-3 Monate

2-4 Tge.	Fall 33
1-2 Wo.	Fall 43
2 Wo.	Fall 5
2 Wo.	Fall 51
2-3 Wo.	Fall 18
2-3 Wo.	Fall 52
3 Wo.	Fall 45
3-4 Wo.	Fall 44
4-5 Wo.	Fall 23
5-6 Wo.	Fall 31
5-6 Wo.	Fall 49
6 Wo.	Fall 16
6-8 Wo.	Fall 19
6-8 Wo.	Fall 50
6-10 Wo.	Fall 39
10-11 Wo.	Fall 3
10-11 Wo.	Fall 4
10-12 Wo.	Fall 37
10-12 Wo.	Fall 47
10-12 Wo.	Fall 48
10-12 Wo.	Fall 52
10-12 Wo.	Fall 53

II. Gruppe:

3 Monate-Pubertät

3-4 Mon.	Fall 10
3-4 Mon.	Fall 11
3-4 Mon.	Fall 36
3-4 Mon.	Fall 38
3-4 Mon.	Fall 41
4-5 Mon.	Fall 34
4-5 Mon.	Fall 42
5-6 Mon.	Fall 40
6-7 Mon.	Fall 46
12 Mon.	Fall 35

Gruppe I: Geburt - 3 Monate 21 Fälle (Abb.5,6)

Die in der Gruppe I der postnatalen Hoden untersuchten männlichen Gonaden stammten von Kälbern, von denen das jüngste 2-4 Tage und das älteste 10-12 Wochen alt war.

Histologie. Das histologische Bild der Hoden der Gruppe I ist gekennzeichnet durch eine Größenzunahme der bereits bestehenden und in den vorherigen Gruppen beschriebenen Hodenstrukturen. Die sekundäre Tunica albuginea wird noch breiter, in der Tunica vasorum treten sehr große und teilweise prall mit Blut gefüllte Gefäße auf, wodurch diese Schicht 3-4mal so dick erscheint wie die Tunica fibrosa. An der tubuliwärts gelegenen Seite der Tunica vasorum entwickeln sich in dieser Entwicklungsperiode zunächst noch schwach sichtbare, bindegewebige Verdickungen, die später zapfenartige Gestalt einnehmen und in die Tubulischicht vordringen. Dabei handelt es sich um die späteren Septen, die das Hodenparenchym in einzelne Lobuli aufteilen.

In den ersten Wochen nach der Geburt dominiert noch das intertubuläre Gewebe, in dem die Hodentubuli unregelmäßig, sich nicht berührend, verteilt sind. Gegen Ende der 10.Woche hingegen hat sich das Bild geändert: Die Tubuli sind infolge Umfangsvermehrung größer geworden und näher aneinander gerückt und haben so das interstitielle Gewebe auf ca. die Hälfte reduziert. Das intertubuläre Gewebe setzt sich aus gut voneinander differenzierbaren Leydigzellen und Bindegewebszellen zusammen, erstere bilden sogar bereits größere zusammenhängende Zellverbände.

Der Aufbau der Hodentubuli weist im Vergleich zu den schon beschriebenen fetalen Samenkanälchen keine wesentlichen Veränderungen auf: außen, die Membrana propria mantelartig umgebend, befindet sich eine 2-3schichtige fibrozytenschicht, während zentralwärts die undifferenzierten Hodenzellen aufgereiht sitzen (Bis-Zellen). Im Durchschnitt befinden sich ca.25 solcher Zellen in jedem Tubulus. Einige von ihnen zeigen bereits am Ende der 12.Woche deutliche Degenerationerscheinungen, während bei einer immer größer werdenden Zahl von Bis-Zellen die schon beschriebene Umwandlung zu Sertoli-Zellen anhält. Cis-Zellen sind in dieser Gruppe nur sehr unregelmäßig und nur sehr gering vor-

handen: Im Durchschnitt werden 0-4 solcher Zellen gefunden.

In jedem Samenkanälchen können 3-4 Samenmutterzellen gefunden werden; sie liegen sowohl axial als auch basal auf der Tunica propria. Verschiedentlich können Riesenspermatogonien und zugrunde gehende Spermatogonien festgestellt werden. Auch am Ende dieser Entwicklungsperiode findet bei den untersuchten Hoden eine Spermiogenese nicht statt.

Weisen die Tubulilumina der jüngsten Hoden dieser Gruppe noch die bereits beschriebene streifenförmige Struktur auf, so treten in den Lumina der Samenkanälchen von 10-12 Wochen alten Kälbern erstmals deutlich sichtbare spaltenförmige Hohlräume auf.

Im Verlaufe dieses Entwicklungsabschnittes verschwindet die noch teilweise vorhandene primäre Tunica albuginea vollends, so daß das Rete testis nun überall mit den Hodentubuli in Berührung treten kann.

Gewebekultur. Die zu den Hoden der Gruppe I angelegten Subkulturen wurden bis zum 7.Tag gezüchtet.

In allen Deckglaskulturen treten die vier eingangs beschriebenen Zellarten auf.

Wie in allen bisher untersuchten Subkulturen, so herrschen auch bei den Deckglaskulturen der Gruppe I die fibrozytenartigen Zellen vor. Ein Unterschied zu den fibrozytenartigen Zellen der fetalen Hodenkulturen ist nicht feststellbar, allerdings ist ihr Anteil kleiner geworden, er beträgt im Durchschnitt 60%.

Zugenommen hat dagegen die Zahl der epithelartigen Zellen, sie variiert im Mittel zwischen 25 und 30%. In jüngeren wie auch in älteren Kulturen bilden sie teilweise kleinere Zellverbände, in der Regel aber liegen sie zu zweit oder dritt zwischen den fibrozytenartigen Zellen. Auffallend erscheint es, daß vor allem in Subkulturen mit geringem Wachstum der Anteil an epitheloiden Zellen größer ist, als in Deckglaskulturen mit sehr gutem Wachstum. (Fall 37 Kalb: 10-12 Wochen, S₁: 1.Tag). Unter den epithelartigen Zellen befinden sich in einer Reihe von Subkulturen auch solche Zellen, die als "Bis-Zellähnliche-Zellen" angesprochen werden könnten. Die Mitoseaktivität sowohl der fibrozyten- als auch der epithelartigen Zellen ist in allen untersuchten Kulturen gering, sie beträgt maximal 1%.

In vielen Zelleibern der epithel- und fibrozytenartigen Zellen sind polyedrische bis runde Einschlüsse zu finden, die im Zellzytoplasma verteilt liegen, die Zellkerne sind nicht verändert.

Mehrere Deckglaskulturen innerhalb dieser Gruppe wurden mit Fettrot gefärbt, um die für die Leydigzellen typischen Fetteinschlüsse darzustellen, diese konnten jedoch nicht festgestellt werden.

Der Anteil der Keimzellen schwankt zwischen 10 und 15%. Auch bei diesen kann hinsichtlich der Morphologie kein Unterschied zu den Keimzellen fetaler Hodenkulturen erkannt werden. Ihre mitotische Aktivität ist auch innerhalb dieser Gruppe unverändert hoch, sie umfaßt in den meisten Fällen $\frac{2}{3}$ aller Keimzellen. Einen gewissen Einfluß auf die Mitoseaktivität scheint das Wachstum der übrigen Zellen zu haben: In sehr guten und dichten Kulturen beträgt sie $\frac{2}{3}$ und mehr der vorhandenen Keimzellen, in Subkulturen mit mäßigem Wachstum herrschen die Ruhestadien der Keimzellen vor.

Einige Subkulturen wurden mit kühl gepuffertem Formalin bzw. mit Carnoy fixiert (Fall Nr. 3/18/19/23/44/45). In diesen Deckglaskulturen weisen vornehmlich die Keimzellen Schrumpfungerscheinungen auf, während diese bei den anderen Zellen nicht oder nur ganz vereinzelt auftreten.

In recht unterschiedlicher Verteilung treten die kleinen, in der HE- und Feulgen-Färbung rot gefärbten Zellen auf, die als Degenerationsform einer der Monolayer- oder Keimzellen bezeichnet worden sind. Man findet sie sowohl in 2 Tage alten als auch in 5 und 6 Tage alten Kulturen.

Das Wachstum der Subkulturen ist in dieser Gruppe als im Durchschnitt gut zu bezeichnen.

Zur Gruppe I läßt sich zusammenfassend sagen:

1. Die fibrozytenartigen Zellen dominieren auch hier, ihr Anteil beträgt ca.60%.
2. Der Anteil der epitheloiden Zellen ist mit 25-30% höher als in den anderen Gruppen.
3. Der Anteil der Keimzellen beträgt durchschnittlich 10-15%; von diesen befinden sich meist 2/3 in Mitose.
4. Die mitotische Aktivität der epithel- und fibrozytenartigen Zellen beträgt nicht mehr als 1%.
5. Unter den epitheloiden Zellen befinden sich Bis-ähnliche Zellen in unterschiedlicher Menge.
6. Fetteinschlüsse können nicht nachgewiesen werden.

- siehe Tabelle X -

Gruppe I: Tabelle X.

Postnatale Kälbernozen (Geburt-3.Monat) 22 Fälle

all	S ₁ : 1.Tg	S ₁ : 2.Tg	S ₁ : 3.Tg	S ₁ : 4.Tg	S ₁ : 5.Tg
70 -6 10	W:+++; F:80%,E:30%, Kz:10%, viele Kz degeneriert.	W:+++; F:60%,E:30%, Kz:10%, alle in Mitose.	W:+++; F:50%,E:30%, Kz:15-20%, 2/3 in Mitose	W:++; F:60-70%,E:30%, Kz: alle degeneriert.	
70 -6 10	W:+++; F:50-60%,E:20- 25%,Kz:15-20%, d.Hälfte in Mit.	W:++; F:70-80%,E:20%, Kz:5-6%, 2/3 in Mitose.	W:+++; F:60%,E:10-15%, Kz:20-25%, alle in Mitose.	W:++; F:50%,E:20-30%, Kz:20%, 2/3 in Mitose.Viele de- gener.Zellen.	W:+++; F:50%,E:20-30%, Kz:15-20%, 2/3 in Mitose.
70 No	W:++; (2x) F:80%,E:20%, Kz:0%, alle ge- schrunpft,da mit kuhl gep.Form. fixiert.		W:++; -+++;(2x) F:80%,E:20%, Kz:0%.	S ₁ : 9.Tg W:++;F:90%, E:10%,Kz:0%.	
70 -8 Vo.	W:++; F:60%,E:20-25%, Kz:10-15%,jedoch infolge Fix.mit k.gep.Form.ge- schrunpft.	W:++; F:60-65%,E:20%, Kz:10-15%, alle geschrunpft. W:+++; F:60%,E:20-25%, Kz:10-15%.		W:+++; F:80%,E:20%, Kz:0%	
70 -8 Vo.	W:++; F:70%,E:20-25%, Kz:5%,alle im Ruhestadium.	W:++; F:50-60%,E:20- 30%,darunter Bis- ähnliche Zellen Kz:10-15%	W:+++; F:60%,E:20-25%, Kz:10-15%, 2/3 in Mit. Daneben auch zahlreiche degenerierte Zellen. W:++; F:80%, E:20%,Kz:0%.	W:++-+++; F:60-65%,E:20%, Kz:15%,alle in Mitose.	W:++; F:60%,E:20-25%, darunter Bis- ähnliche Zel- len,Kz:10-15%.
69 -11 Vo.		W:++; F:70-80%,E:20- 30%,darunter Bis- ähnliche Zellen. Kz:0%.	W:+++; F:80-90%,E:10- 20%,Kz:0%,alle geschrunpft.	S ₁ :7.Tg W:+++; F:70%,E:10-15%, Kz:10-15%, 2/3 in Mitose.	
70 -11 Vo.	W:++; F:25%,E:70%, Kz:3-5%, die Hälfte in Mitose W:-; F:20-30%,E:70%, Kz:1-4%,alle in Ruhe.	W:++-+++; F:50-60%,E:20- 30%,Kz:10-15%, 2/3 in Mitose. Fettrot: keine Fetteinschlüsse.	W:-; F:70-80%,E:20- 30%, Kz:2-4%, alle in Mitose.	W:-;Färbung mit Fettrot zeigen alle Zellen Fett- einschlüsse,dies Ausdruck der De- generation.	S ₁ :10.Tg W:+++; F:80-90%, E:5-6%,Kz:3-5% alle in Mitose

W=Wachstum

F=fibrozytenartige Zellen

- schlechtes W

++ gutes W

E=epithelartige Zellen

+- mäßiges W

+++ sehr gutes W,

Kz=Keimzellen

Subkultur dicht

Gruppe I: Tabelle X (Fortsetzung)

Fall	S ₁ : 1.Tg	S ₁ : 2.Tg	S ₁ : 3.Tg	S ₁ : 4.Tg	S ₁ : 5.Tg
4/69 10-11 Wo			N:+++; F:65%,E:20%, Kz:15%, 2/3 in Mitose.	S ₁ : 7.Tg W:+++; F:70-80%,E:10- 15%,Kz:5-10%, 1/3 in Mitose. N:+++;F:70-80%, E:15%,Kz:5-6%, alle in Mitose.	
47/70 10-12 Wo.	N:+-; F:60%,E:20-30%, Kz:10%, 2/3 in Mitose.	N:+-; F:60%,E:20-30%, Kz:5%,alle in Ruhe.		N:+++; F:60%,E:15-20%, Kz:5%, 2/3 in Mitose.	N:+++; F:60%,E:15-20%, Kz:15-20%,alle in Mitose.
33/70 2-4 Tg.	N:+++;F:70%,E:15%, Kz:15%,die Häl- fte in Mitose.		W:+++;F:75%,E:10% Kz:15%,2/3 i.Mit. viele kleine rote Zellen(Degenera- tion)	N:+++;Einzelzel- len,F:90-95%,E: 5%,Kz:1-2%,alle in Mitose.	N:+++;F:90%, E:7-8%,Kz:2%, alle in Mitose, viele Zelldege- nerationen
43/70 1.-2. No.	N:++;Einzelzellen F:70-75%,E:20%, Kz:4-5%, 2/3 in Ruhestadium.	N:++++;F:70%,E: 20%,darunter ei- nige His-ähnliche Zellen,Kz:5-10%, d.Hälfte i.Mit.	N:++;F:70-80%,E: 15%,Kz:5-5%,alle in Mitose,viele Degenerations- erscheinungen.	N:+++++; F:60-70%,E:20%, Kz:10%, 2/3 in Mitose.	N:+++++; F:60-70%,E: 20%,Kz:10%, 2/3 in Mitose.
5/69 2.Wo.	S ₁ : 4.Tg W:+++;F:60-70%, E:15-20%,Kz:10%, alle in Mitose.	S ₁ : 7.Tg W:+++;F:70-75%, E:20%,Kz:5%,alle in Mitose.	S ₁ : 6.Tg W:+++; F:70%, E:10%,Kz:15-20%.		
51/70 2.Wo.	W:+++; F:60%,E:20-25%, Kz:15%,alle in Mitose.Unter d. E-Zellen einige His-ähnliche Zellen.	N:+++; F:70%,E:20-25%, Kz:5%,alle in Mitose.	W:++++;F:60-70%, E:20%,Kz:10-15%, alle geschrumpft- viele degenerier- te rote Zellen.	N:+++++; F:70-80%,E:10%, Kz:15%, 2/3 in Mitose.	N:+-; F:65%,E:25-30%, Kz:5-8%,alle i. Ruhestadium.
32/70 2-3 Wo.	W:+++; F:50%,E:40%,Kz: 8-10%,die Hälfte in Mitose,zahl- reiche degener. Zellen.	N:+-; F:55%,E:30%,Kz: 15%,alle in Mit. Viele deg.Zellen.	W:+-; F:35-40%,E:10%, Kz:1%,alle i.Mit.	N:+++; F:90%,E:5-10%, Kz:1-2%,alle in Mitose.	
18/70 2-3 Wo.	W:+-; F:90%,E:5-10%, Kz:0%.	W:+++; F:80%,E:10%,alle Kz:10% geschrump- ft,da m.kuhl gep. Formalin fix.	W:+++; F:80-85%,E:10-15% Alle Kz ge- schrumpft.		S ₁ : 5.Tg W:-; nur F- Zellen.
45/70 3 Wo.	N:+++; F:50%,E:50%, Kz:20%,davon d. Hälfte in Ruhe- stadium.	W:+-; F:70%,E:20%,Kz: 10%,2/3 in Ruhe, viele degener. Zellen.	W:+-; F:70%,E:15%,Kz: 10-15%,d.Hälfte in Mitose.		N:+++; F:50%,E:25-30%, Kz:ca.20%,2/3 in Mitose.

Gruppe I: Tabelle X (Fortsetzung)

Ball	S ₁ : 1.Tg	S ₁ : 2.Tg	S ₁ : 3.Tg	S ₁ : 4.Tg	S ₁ : 5.Tg
4/70 3-4 No.		N:++-; F:80-85%,E:5-6%, Kz:5-10%,infolge Fix.fast alle de- generiert.	W:+-; F:80%,E:10-15%, Kz:5%,die Hälfte in Mitose. Kz fast alle degene- riert.		W:+++; F:60%,E:25-30% darunter Bis- ähnl.Zellen. Kz:10-15%,2/3 in Mitose.
3/70 4-5 No.	N:+++; F:85-90%,E:7-8%, Kz:1-2%, 2/3 in Mitose.	N:+++; F:90%,E:5-6%,Kz: 4-5%,sie weisen starke Schrump- fungserscheinun- gen auf(fixations- bedingt) N:++;F:95%,E:5%, Kz:0%.		W:++; F:95%,E:4-5%, Kz:0.5%,alle ge- schrumpft.(Fix. mit kuhl gep. Formalin).	
7/70 12. No.	N:+-; F:40%,E:50-60%, Kz:2%,alle in Mit.,unter den E-Zellen einige Bis-ähnl.Zellen N:++; F:20-30%,E:70%, Kz:1-2%,alle in Mitose	W:+-; F:70-75%,E:15- 20%,Kz:5%,alle i.Ruhestadium.	W:++++; F:50%,E:40-50%, darunter Bis-Zel- len, Kz:2-3%,al- le im Ruhestad.	W:+-; F:20-25%,E:60- 70%,Kz:5%, 2/3 im Ruhestadium.	
3/70 0-22 No.	W:+++; F:45-50%,E:25- 30%,Kz:25%, da- von die Hälfte in Mitose.	W:++++; F:60%,E:25-30%, Kz:10-15%,2/3 i. Mitose. E.u.F.- Zellen wie ge- wöhnlich sehr vakuolenreich.	W:+++; F:50%,E:30%, Kz:20%, davon 2/3 in Mitose.	W:+-; F:70%,E:20-25%, Kz:5%,davon die Hälfte i.Mitose, viele degenerier- te Zellen W:++-+++; F:60%,E:20-30%, Kz:10-15%, 2/3 in Mitose.	W:+-; F:70%,E:20-25%, Kz:5%,davon d. Hälfte in Mit.
2/70 0-12 No.	W:+-; F:80%,E:10-15%, Kz:3-5%,davon d. Hälfte in Mit.	W:+++; F:60%,E:10%, Kz:25-30%, 2/3 in Mitose.	W:+++; F:60%,E:10%, Kz:30%,alle in Mitose.	W:+-; F:80%,E:10-15%, Kz:5-6%,davon d. Hälfte im Ruhe- stadium.	W:+++; F:60-65%,E:20- 25%,Kz:10-15%, 2/3 in Mitose.
3/70 0-12 No.	W:++-+++; F:40%,E:30-35%, darunter einige Bis-ähnl.Zellen. Kz:15-20%,2/3 da- von in Mitose.	W:+++; F:50-60%,E:30- 35%,Kz:5%,alle in Mitose.	W:+++; F:60%,E:20%, Kz:20%,davon d. Hälfte i.Mitose.	W:+-; F:45-50%,E:40-45%, Kz:5-10%,von die- sen d.Hälfte in Ruhestadium.	W:-; F:60%,E:30%, Kz:10%,alle in Ruhestadium. W:++-+++; F:60-70%,E:20%, Kz:8-10%,alle in Mitose.

Gruppe II: 3 Monate bis Pubertät. 10 Fälle. (Abo.7,8)

Histologie: Die in dieser Gruppe untersuchten Hoden stammten von Rindern zwischen 3 und 12 Monaten.

Das histologische Bild gleicht dem der Gruppe I: Infolge Umfangsvermehrung der einzelnen Hodenstrukturen nimmt das interstitielle Gewebe nicht mehr den größten Raum ein wie bisher, sondern es ist auf die immer kleiner werdenden intertubulären Spalten beschränkt. Es besteht aus Leydigzellen und Bindegewebszellen. Die Hodentubuli sind größer geworden, so daß sie sich in zwischen berühren. Auf der Tunica propria, die von einem Fibrozytenmantel umgeben wird, sitzen dicht gedrängt die undifferenzierten Hodenzellen, deren Zahl bis zum 5.-6.postnatalen Lebensmonat auf 40-50 ansteigt. In allen Tubuli findet man Bis-Zellen in der Umwandlung zu Sertolizellen. Ebenso stark hat auch die Zahl der Cis-Zellen zugenommen; sie beträgt bei 3-4 Monate alten Kälberhoden 18-20 pro Tubulus. Zwischen dem 6.und 12.Monat jedoch verringert sich die Zahl beider Zellen wiederum erheblich, so daß im Hoden eines 12 Monate alten Jungbullen nur noch einige wenige Bis-Zellen und keine Cis-Zellen mehr zu finden sind. Von den noch verbleibenden Bis-Zellen weisen über 2/3 Degenerationserscheinungen auf. Daneben liegen die Sertolizellen auf der Membrana propria, die sich durch ihr verändertes Aussehen gut von den noch vorhandenen Bis-Zellen unterscheiden lassen.

Als sehr konstant erweist sich der Anteil der Spermatogonien, er beträgt bis zum 6.-7.Monat nicht mehr als 4-5 pro Tubulus. Im Hoden des 12 Monate alten Tieres hingegen ist die Spermiogenese bereits in vollem Gange. Im Zentrum befindet sich das Rete testis, das nach Verschwinden der primären Tunica propria in zunehmendem Maße mit den Hodentubuli in Verbindung tritt.

Die gut ausgeprägte sekundäre Tunica propria umgibt das gesamte Hodenparenchym mantelartig. Die Tunica fibrosa wird im Verlaufe dieses Entwicklungsabschnittes immer dünner und kompakter, um so breiter erscheint dadurch die Tunica vasorum, an ihrer Unterseite werden die zapfenartigen bindegewebigen Ausstülpungen immer deutlicher; bei dem Hoden des 12 Monate alten Jungbullen sind diese schon tief in das Hodenparenchym eingedrungen.

Gewebekultur. Zu allen Hoden, die in der Gruppe II der postnatalen männlichen Gonaden aufgeführt sind, wurden Gewebekulturen angelegt und die davon erhaltenen Subkulturen im Durchschnitt bis zum 4. Tag gezüchtet.

Die Untersuchung dieser Deckglaskulturen zeigt, daß sich in der Gewebekultur innerhalb der Gruppe II das gleiche Bild bietet wie in allen vorherigen Gruppen: ein deutlicher Unterschied zwischen fetalen und postnatalen Hodenkulturen ist nicht erkennbar.

Es treten auch hier die gleichen Zellarten auf wie in den bisher untersuchten Subkulturen. Die fibrozytenartigen Zellen beherrschen in fast allen Deckglaskulturen mit ca. 60-70% das Zellbild. Auch in Form und Aussehen gleichen sie denen der fetalen Hodenkulturen. Ähnlich der vorher besprochenen Gruppe I ist der Anteil der epitheloiden Zellen auch bei diesen Subkulturen größer als in den fetalen Hodenkulturen, er beträgt durchschnittlich 20-25%. Unter den epithelartigen Zellen fallen immer wieder die als Bis-Zell-ähnlichen Zellen beschriebenen Zellen auf. Sie sind in unterschiedlicher Anzahl und Verteilung in fast allen Subkulturen der Gruppe II der postnatalen Hoden zu finden.

In vielen Zelleibern der epithel- und fibrozytenartigen Zellen befinden sich runde bis polyedrische Einschlüsse, teilweise rund um den Zellkern, teilweise regellos im Zellplasma verteilt. In der Regel weist der Zellkern solcher Zellen keine Veränderungen auf. Auch ist eine Färbung mit Fettrot zum Nachweis von für Leydigzellen kennzeichnenden Lipoideneinschlüssen in allen Fällen negativ verlaufen.

Die mitotische Aktivität sowohl der epithel- als auch der fibrozytenartigen Zellen ist sehr gering, sie überschreitet 1% nicht.

Die Keimzellen, deren Anteil in den Subkulturen dieser Gruppe 10-15% beträgt, weisen ebenso keine Unterschiede zu den Keimzellen der fetalen Hodenkulturen auf, ihre Mitoseaktivität ist, wie auch in allen bisher beschriebenen Fällen, sehr hoch, sie umfaßt meist $\frac{2}{3}$ und mehr aller vorhandenen Keimzellen. Allerdings wird ihre mitotische Aktivität vom Wachstum der übrigen Zellen beeinflusst: in Subkulturen mit mäßigem bis schlechtem

Wachstum befinden sich die meisten im Ruhestadium, während umgekehrt in Deckglaskulturen mit gutem bis sehr gutem Wachstum die meisten Keimzellen sich in Teilung befinden. Im Fall 35 (Jungbulle 12 Monate) sind in fast allen Subkulturen Spermienköpfe in unterschiedlicher Anzahl und Verteilung anzutreffen.

Insgesamt kann das Wachstum aller Subkulturen dieser Gruppe als gut bezeichnet werden.

Die Untersuchungen der Gewebekulturen der Gruppe II können wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Der Anteil der fibrozytenartigen Zellen beträgt ca. 60-70%.
2. Die epitheloiden Zellen sind in den Deckglaskulturen dieser Gruppe mit durchschnittlich 20-25% vertreten.
3. Die Mitoseaktivität ist bei epithel- und fibrozytenartigen Zellen gering (1% und weniger).
4. In den meisten epithel- und fibrozytenartigen Zellen sind vakuolige Einschlüsse zu finden.
5. Der Keimzellanteil beträgt 10-15%, ca. 2/3 von diesen befindet sich meist in Mitose.
6. Im Fall 35 treten Spermienköpfe auf.
7. Die für Leydigzellen kennzeichnenden Fetteinschlüsse sind in den mit Fettrot gefärbten Subkulturen nicht zu finden.
8. In der überwiegenden Mehrzahl der Subkulturen der Gruppe II der postnatalen Hoden ist das Wachstum gut.

-siehe Tabelle XI-

Gruppe II: Tabelle XI.

Postnatale Kälberhoden (3. Monat-Pubertät) 10 Fälle

	S ₁ : 1.Tg	S ₁ : 2.Tg	S ₁ : 3.Tg	S ₁ : 4.Tg	S ₁ : 5.Tg
0/09 4 n.		N:+++; F:50%,E:20-30%, Kz:20%,davon 2/3 in Mitose.Bis-ähn- liche Zellen.	N:++++; F:70-80%,E:10%, Kz:10%,d.Hälfte in Mit.Zelleiber vakuolig. N:++-+; F:60-70%,E:26%, Kz:10%,2/3 davon in Mitose.	N:+++; F:70-80%,E:10%, Kz:5-10%,d.Hälf- te in Mitose.	
69 4 n.	N:++; F:40%,E:50%,Kz: 5-10%,alle in Mitose. N:+-;F:60-70%, E:20-25%,Kz:5%, alle in Mitose.	N:+++; F:60-65%,E:10-15%, Kz:15-20%,alle in Mitose.	N:++-+++; F:50%,E:20-30%, Kz:15-20%, 2/3 davon in Mitose. W:++-+++; F:50-60%,E:20-25%, Kz:15%,2/3 i.Mit.	N:+++; F:70%,E:10-15%, Kz:10-15%,alle in Mitose.	S ₁ : 7.Tg W:+++; F:70-75%,E:10- 15%,Kz:10%, 2/3 in Mit. S ₁ : 8.Tg W:++;F:70%, E:20%,Kz:10%, davon d.Hälfte in Mitose.
70 4 n.	W:++-+++; F:60%,E:20-25%, Kz:10-15%,alle in Mitose.	N:+-; F:70-75%,E:10%, Kz:10-15%,alle i. Mitose. Unter d. E-Zellen Bis-ähn- liche Zellen.		N:-; F:80%,E:15-20%, Kz:1%,alle in Mitose.	S ₁ : 6.Tg W:++-+++; F:40-50%,E:40- 50%,Kz:2-3%, alle in Mit., viele degener. Zellen
70 4 n.	N:+++; F:40%,E:40%(davon einige Bis-Zellen) Kz:20%,2/3 i.Mit. W:++; F:70%,E:20-25%, Kz:1-5%,alle ge- schrumpft(fixa- tionsbedingt)	W:-; F:80%,E:10-15%, Kz:3-5%,alle in Mitose.	N:+++; F:70%,E:20-30%, Kz:10-15%,d.Hälf- te davon i.Ruhe- stadium,degener. Zellen. W:++; F:60%,E:15-20%, Kz:10-20%,alle in Mitose.	N:+++; F:70%,E:10-20%, darunter einige Bis-ähnliche Zellen, Kz:10%,mehr als 2/3 in Mitose.	
70 4 n.	W:++; F:70-80%,E:10-15%, darunter einige Bis-ähnliche Zellen, Kz:5%, 2/3 im Ruhestadium.	N:++++; F:50%,E:30-35%, Kz:10-15%, 2/3 im Ruhestadium.	W:+-; F:60-70%,E:30%, Kz:1-2%,alle i. Mitose. W:+-; F:60%,E:30%,Kz: 10%,2/3 in Mit.	N:++-+++; F:50-60%,E:10%, Kz:0%,viele deg. Zellen.	
70 4 n.	W:++; F:70-75%,E:20%, Kz:5-10%,alle i. Mitose.		W:++; F:70-80%,E:15-20%, Kz:3-4%, davon 2/3 in Mitose.	W:+-; F:80-90%,E:10-20%, Kz:0%,viele deg. Zellen.	N:+-; F:80-85%, E:10-15%,Kz:1% alle in Mitose

W=Wachstum

F=fibrozytenartige
ZellenE=epithelartige
Zellen

Kz=Keimzellen

- = schlechtes W

+- = mäßiges W

++ = gutes W

+++ = sehr gutes W,
Subkultur dicht.

-11-

Gruppe II: Tabelle XI (Fortsetzung)

Fall	S ₁ : 1.Tg	S ₁ : 2.Tg	S ₁ : 3.Tg	S ₁ : 4.Tg	S ₁ : 5.Tg
42/70 4-5 Mon.	N:++; F:70%,E:20%,Kz:10-15%,davon 2/3 i. Mitose. Fettrotfärbung: K.Lipoideinschlusse.	N:++-+++; F:70-75%,E:15-20%,darunter einige Bis-ähnl. Zellen.Kz:5%,davon 2/3 i.Mit. Zellen weisen viele Vakuolen auf.	N:++; F:80%,E:20%,Kz:0%.	N:++; F:70-80%,E:20%,Kz:10%,2/3 davon i.Mitose.	
40/70 5-6 Mon.	N:++; F:70%,E:20%,darunter einige Bis-ähnl.Zellen. Kz:10%,2/3 davon im Ruhestadium.		N:++-+++; F:60%,E:20-25%,Kz:5-10%,davon 2/3 in Mitose.	N:++; F:60%,E:30-35%,Kz:5-10%, 2/3 in Mitose.	N:++-+++; F:80-90%,E:5-10%,Kz:1-2%, alle in Mitose.
46/70 6-7 Mon.	N:++; F:70%,E:25%,darunter einige Bis-ähnl.Zellen, Kz:5%, 2/3 im Ruhestadium.	N:+-; F:50%,E:30-35%,darunter einige Bis-ähnl.Zellen, Kz:10-15%, 2/3 i. Mitose.	N:++-+++; F:60%,E:30-35%,Kz:10-15%, 2/3 in Mitose.	N:+-; F:60%,E:30%,Kz:20%,alle in Mitose.	
35/70 12 Mon.	N:++; F:50%,E:30%,Kz:20%, 2/3 in Mitose. N:++-+++; F:80-85%,E:10-15%,Kz:5%,daneben Spermienköpfe.	N:++; F:85%,E:5-10%,Kz:5-6%,Spermienköpfe. N:+++; F:80%,E:10-15%,Kz:5%,einige Spermienköpfe. Kz.alte in Mitose.	N:--; F:40%,E:50%,Kz:0%,unter den E-Zellen viele Bisähnl.Zellen. N:+-; F:80-85%,E:5-5%,Kz:10%, 2/3 in Mitose.	N:+-; F:85%,E:3-5%,Kz:0%,dafür ca. 10% Spermienköpfe in Mitose.	N:++-+++; F:50%,E:40-50%,Kz:1%, alle in Mitose.

IV. DISKUSSION

Bei der Kultivierung von Hodengewebe ist zu erwarten, daß vier verschiedene Zellarten in Kultur gebracht werden: Bindegewebs-, Leydig- und Sertolizellen bzw. deren Vorstufen und Zellen der Spermiogenese.

An Hand der Morphologie und des färberischen Verhaltens wurde eine Zelldifferenzierung der Deckglaskulturen vorgenommen. Im wesentlichen können drei Zelltypen unterschieden werden: 1) die fibrozytenartigen Zellen, 2) die epitheloiden Zellen und 3) die Keimzellen. Die beiden zuerst genannten Zellarten sind hauptsächlich an Hand ihrer unterschiedlichen Kernform voneinander abzugrenzen. Zellen mit länglichen, ovalen oder spindligen Kernen werden als fibroblastenartige Zellen angesprochen, solche mit runden Kernen als epithelartige. Daneben kann in nicht zu dichten Kulturen noch die Form des Zelleibes als Unterscheidungsmerkmal mit herangezogen werden: Bei den fibroblastenartigen Zellen ist dieser in der Regel länglich, manchmal hingegen auch dreieckig mit langen Ausläufern, derjenige der epitheloiden Zellen rundlich bis polygonal.

In allen Deckglaskulturen überwiegen die fibrozytenartigen Zellen. In den Subkulturen der fetalen Hoden sind sie zu 70-90%, in denjenigen der postnatalen Hoden zu 50-70% vorhanden. Die fibrozytenartigen Zellen haben ihren Ursprung in den Bindegewebszellen des interstitiellen Gewebes, der Tunica propria und, soweit es sich um fetale Hoden handelt, von denjenigen der Tunica albuginea und des Rete testis bzw. Reteblastem. Da bei den fetalen männlichen Gonaden in der Regel die Tunica albuginea und das Rete testis nicht vollständig entfernt werden konnten, war das Ausgangsmaterial fibrozytenreicher als das der postnatalen Hoden, bei denen lediglich Gewebstückchen aus der Tubulizone verarbeitet wurden. Außerdem ist das interstitielle Gewebe des fetalen Hodens bindegewebsreicher, als das der postnatalen, in denen der intertubuläre Raum hauptsächlich von Leydigzellen ausgefüllt wird. Daher ist der Anteil der fibrozytenartigen Zellen in den fetalen Hodenkulturen höher als in den postnatalen. Die Mitoseaktivität der fibroblastenartigen Zellen ist sehr gering. In allen

untersuchten Deckglaskulturen geht ihr Anteil nicht über 1% hinaus. Dabei ist es gleichgültig, ob es sich um eine Kultur handelt, die einen Tag oder fünf Tage alt ist.

Im Gegensatz zu der eben besprochenen Zellart ist der Anteil der epithelartigen Zellen in allen Subkulturen geringer: In fetalen Hodenkulturen beträgt er 2-4%, in postnatalen etwa zwischen 20 und 25%. Vor allem unter den epithelialen Zellen der postnatalen Hodenzellkulturen fielen häufig Zellen auf, deren kleiner, runder, in der Regel stets gleich großer Kern ein fein granuliertes Kernplasma besaß, in dem sich 1-2 Nukleoli befanden. Ihr Zelleib war polygonal und wies die bereits bei den übrigen Soma-zellen beschriebenen vakuoligen fettnegativen Einschlüsse auf.

An Hand der Ähnlichkeit dieses Zelltyps mit den in den histologischen Hodenpräparaten angetroffenen Bis-Zellen vermuten wir, daß es sich bei diesen Zellen um eben solche handeln könnte.

Als Ausgangsmaterial für die epithelialen Zellen können die Leydig- und Sertolizellen bzw. deren Vorstufen angesehen werden. In jungen Subkulturen fetaler Hoden sind die epithelialen Zellen noch zahlreicher vorhanden als in älteren, da diese mit fortschreitender Kultivierungszeit von den fibrozytenartigen Zellen überwuchert werden. Im Gegensatz dazu bleibt der Anteil der epithelialen Zellen in Subkulturen postnataler Hoden sowohl in jüngeren als auch in älteren Subkulturen relativ konstant.

Daß der Anteil der epithelialen Zellen in den postnatalen höher ist als in den fetalen, liegt ferner daran, daß - wie bereits erwähnt - in den ersteren mehr epitheliale und weniger Bindegewebszellen verarbeitet werden. Die mitotische Aktivität entspricht derjenigen der fibrozytenartigen Zellen.

Weniger Schwierigkeiten hingegen macht die Identifizierung der Keimzellen: Im Ruhestadium stellt sie eine runde kleinere Zelle dar, in der ein ebenfalls meist runder, manchmal aber auch ovaler Kern zentral oder peripher liegt. Das Chromatin ist dicht staubkornartig in ihm verteilt. Der Nukleus ist von einem schmalen Zytoplasmasaum umgeben, der eine hell aufleuchtende Randzone besitzt. Befindet sich die Keimzelle in Mitose, so kann sie sehr polymorphe Formen annehmen. In diesem Zustand ist sie durch ihre von den übrigen Zellen der Subkultur abweichende intensivere Anfärbbarkeit zu erkennen.

Die Keimzellen liegen stets einzeln. Trotz ihrer hohen mitotischen Aktivität werden sie nie in Verbänden angetroffen.

Der Keimzellanteil schwankt in den fetalen Hodenkulturen zwischen 5 und 20%, in den postnatalen Hodenkulturen hingegen erweist er sich mit durchschnittlich 10-15% als ziemlich konstant.

In allen Subkulturen fällt die hohe mitotische Aktivität der Keimzellen auf. Sie erfaßt in der Regel $\frac{2}{3}$ und mehr aller vorhandenen Keimzellen, im Gegensatz zu der niedrigen Mitoserate der fibroblasten- und epithelartigen Zellen, die 1% nicht übersteigt, obgleich diese beiden Zelltypen 80-90% aller Zellen ausmachen. Dies bedeutet, daß von 100 Somazellen einer Kultur sich nur eine Zelle in Mitose befindet, während sich von 10 kultivierten Keimzellen 6-7 teilen. Diese hohe Mitoseaktivität stellt somit ein weiteres wichtiges Differenzierungsmerkmal dieser Zellart dar.

Die Keimzellen haben unserer Meinung nach ihren Ursprung in den Gonozyten der in Kultur gebrachten Hoden.

Es handelt sich dabei um Samenmutterzellen vom Typ A, d.s. nach LEBLOND und CLERMONT (1952) kleine runde Zellen, in deren Kernen das Chromatin dicht staubkornartig verteilt ist. Diese Spermatogonien A sind identisch mit den Stamm-Spermatogonien STARCKs (1965).

Da die in den Subkulturen auftretenden Keimzellen hinsichtlich ihrer Form und ihrer Größe und auch hinsichtlich der Chromatinverteilung im Kern den Spermatogonien A sehr ähneln, liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei diesen um solche handelt.

Die Kulturbedingungen lassen sich nicht standardisieren, daher sind die teilweise erheblichen Schwankungen der Keimzellzahlen innerhalb einer Subkulturreihe oder zwischen zwei verschiedenen Altersgruppen zu erklären.

In den letzten Jahren sind entsprechend dem steigenden Interesse an dem vorliegenden Problem eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt worden, mit dem Ziel, die Zellen einer Hodengewebskultur zu differenzieren. Die Ergebnisse dieser Arbeiten variieren zwischen der Feststellung, daß es nicht möglich sei, die Somazellen einer Hodenzellkultur (Monolayerkultur) lichtoptisch zu unterscheiden (STEINBERGER-STEINBERGER 1966) bzw. bis zur ge-

nauen Beschreibung von Sertoli-, Leydig- und Keimzellen (JORDAN-KATSH-de STACKELBURG 1961, KODANI-KODANI 1966).

Allen zuletzt genannten Autoren ist es zwar gelungen, eine Differenzierung der Zellen der Hodengewebekultur durchzuführen, doch kommen sie keineswegs zu gleichen Ergebnissen: So beschreiben etwa JORDAN-KATSH und de STACKELBURG (1961) die Sertolizelle in der Zellkultur als eine epitheloide Zelle mit 3 Nukleoli, einer scharf gezeichneten Kernmembran und fibrillärer Mitochondrienstrukturen im Zytoplasma. Nach KODANI und KODANI (1966) hingegen hat die Sertolizelle zwar auch epithelialen Charakter, besitzt aber nur einen Nukleolus, heterochromatische Granula, nukleäre Karyosomen und schließlich die für diese Zellart kennzeichnenden Kernfalten.

Aus der Gegenüberstellung der voneinander teilweise recht unterschiedlichen Beschreibung der gezüchteten Sertolizellen geht hervor, daß die Autoren nur darin übereinstimmen, daß es sich in vitro bei den Hodenstützzellen um epitheliale Zellen handelt; alle Angaben über weitere Merkmale differieren bei den verschiedenen Wissenschaftlern sehr stark.

KODANI-KODANI (1966) züchteten Sertolizellen in Reinkultur. Ihre Beschreibung dieser Zelle dürfte daher noch am zutreffendsten sein.

Wir haben jedoch in keiner der untersuchten Deckglaskulturen Zellen gefunden, die die oben beschriebenen Merkmale aufweisen, auch nicht in solchen, die von uns schon als epithelartige Zellen klassifiziert wurden.

JORDAN-KATSH-de STACKELBURG (1961) differenzierten in ihren Hodenzellkulturen noch zusätzliche Leydigzellen, die sie, wie folgt, beschreiben: eine epithelartige Zelle, deren Kern längliche bis ovoide Form besitzt; das Zytoplasma ist leicht granuliert und hat zahlreiche Fetteinschlüsse. Von unseren, zum Nachweis der Lipoideinschlüsse mit Fettrot gefärbten Deckglaskulturen waren die meisten negativ. Nur einige ältere Subkulturen wiesen die beschriebenen Fetteinschlüsse auf. Diese wurden aber als Zeichen einer Degeneration gedeutet.

STEINBERGER-STEINBERGER-VILAR-SALAMON (1966) beschreiben die Leydigzellen eines Monolayer, welche sie durch den Nachweis

der 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase kennzeichneten, als eine spindlige Zelle mit teilweise längeren zytoplasmatischen Ausläufern. Ihr Kern soll 1-4 Nukleoli besitzen. Auch in unseren Deckglaskulturen traten häufiger spindelförmige Zellen auf mit langen Zytoplasmafortsätzen. Da wir aber keine histochemischen Nachweise durchgeführt haben, können wir solche Zellen nur auf Grund ihres Aussehens nicht als Leydigzellen ansprechen.

JORDAN-KATSH und de STACKELBURG (1961) beschreiben die in-vitro gewachsenen Spermiozyten als große, runde, teilweise auch ovale Zellen, deren besonderes Merkmal die nahe dem Kern gelegenen perjodatreaktiven idiosomatischen Granula sein sollen. Im Gegensatz zu den Arbeiten von STEINBERGER-STEINBERGER (1966) befanden sich bei ihnen alle Keimzellen im Medium suspendiert. Schließlich vermuten sie auch eine Spermiogenese in-vitro, die STEINBERGER-STEINBERGER (1966) hingegen ausdrücklich verneinen.

Nach BLOMM und FAWCETT (1969) beträgt die Samenreifung beim Menschen ca. 64 Tage. Für das Rind konnten entsprechende Angaben nicht gefunden werden, es dürften jedoch ähnliche Zeiten gelten. Die Kulturen von JORDAN, KATSH und de STACKELBURG (1961) waren teilweise nur bis zu 37 Tagen alt, so daß von daher schon eine in-vitro ablaufende Spermiogenese unwahrscheinlich erscheint. Es ist vielmehr anzunehmen, daß die verschiedenen Keimzellstadien bereits im Ausgangsmaterial vorhanden waren und lediglich mitkultiviert worden sind. Die Autoren selbst schließen diese Möglichkeit nicht aus. In Kurzzeitzellkulturen aus den Hoden eines 12 Monate alten Bullens fanden auch wir Spermien. Wir sind sicher, daß es sich dabei nicht um das Ergebnis einer in-vitro abgelaufenen Spermiogenese handelt, sondern um im Ausgangsmaterial bereits vorhandene und mitkultivierte Spermien.

Die Beschreibung der Keimzellen in der Literatur stimmt mit der unsrigen nur insofern überein, als diese als kleine, runde, teilweise auch ovale Zellen gekennzeichnet werden können. Ihr typisches färberisches Verhalten und ihre hohe, fast konstante Mitoseaktivität, die nicht zuletzt ein wichtiges Differenzierungsmerkmal dieser Zellart darstellt, bleiben unerwähnt. Im Gegensatz zu STEINBERGER-STEINBERGER (1966) und JORDAN-KATSH und de STACKELBURG (1966) finden w i r Spermatogonien auf der Deck-

glasoberfläche. Es wäre denkbar, daß die Keimzelle, damit sie auf einer festen Oberfläche anhaften kann, anderer Zellen bedarf, z.B. der fibrozytenartigen Zellen.

Es fällt auf, daß die Zahl der Keimzellen trotz ihrer hohen mitotischen Aktivität innerhalb der ersten Kultivierungstage nicht oder nur unwesentlich ansteigt. Es ist daher zu vermuten, daß sich die Tochterzellen gleich nach ihrer Entstehung ablösen und ins Medium übertreten.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß die Keimzellen trotz ihrer hohen mitotischen Aktivität nie Zellverbände bilden. Wahrscheinlich lösen sich die Tochterkeimzellen gleich nach ihrer Entstehung vom Deckglas ab, um an einer anderen Stelle der Deckglaskultur wieder anzuhaften.

In weniger dichten Monolayers sind meistens auch weniger Keimzellen vorhanden. Ferner ist es möglich, daß die Bebrütungstemperatur einen wichtigen Einfluß auf das Anhaften der Keimzellen auf der Deckglasoberfläche ausübt. Während unsere kulturen bei 37°C aufbewahrt wurden, betrug die Brutschranktemperatur in den Arbeiten von STEINBERGER-STEINBERGER (1966) nur 31°C.

Die Ergebnisse der Literatur mit den unsrigen kritisch gegeneinander abwägend, ergibt sich, daß wir im Gegensatz zu den oben angeführten Autoren der Meinung sind, daß eine eindeutige, nachvollziehbare Differenzierung der Somazellen in Sertoli-, Leydig- und Bindegewebszellen mit lichtoptischen Methoden nicht möglich ist. Auch die Angaben, die in der Literatur über das Aussehen und Vorkommen von Keimzellen und die festgestellte Spermiogenese gemacht werden, können wir bei unseren, allerdings zeitlich kürzeren, Untersuchungen nicht bestätigt finden. Wir glauben, daß es sich bei den in unseren Deckglaskulturen beschriebenen Keimzellen um Stamm-Spermatogonien - Spermatogonien Typ A - handelt.

Bei der Gegenüberstellung der Untersuchungsergebnisse müssen schließlich noch die teilweise sehr voneinander abweichenden Arbeitsmethoden mit berücksichtigt werden: In der Literatur wurde in der Regel Hanksches oder Eagles Medium mit Serum, Antibiotika-, Vitamin- und Aminosäurezusätzen verwendet, während wir unsere Kulturen mit McCoys Medium und TC 199 Medium anlegten. Dazu kommt noch die jeweils unterschiedliche Bebrütungstemperatur, die

sicherlich einen wesentlichen Einfluß auf die Zellverteilung haben dürfte.

Es muß anderen Methoden vorbehalten bleiben, hier weitere Anhaltspunkte für eine eindeutige Identifizierung der Somazellen innerhalb einer Hodenzellkultur zu finden.

Einen möglichen Weg haben VILAR-STEINBERGER-STEINBERGER (1966) mit histochemischen und elektronenoptischen Untersuchungen an Hodenzellkulturen aufgezeigt.

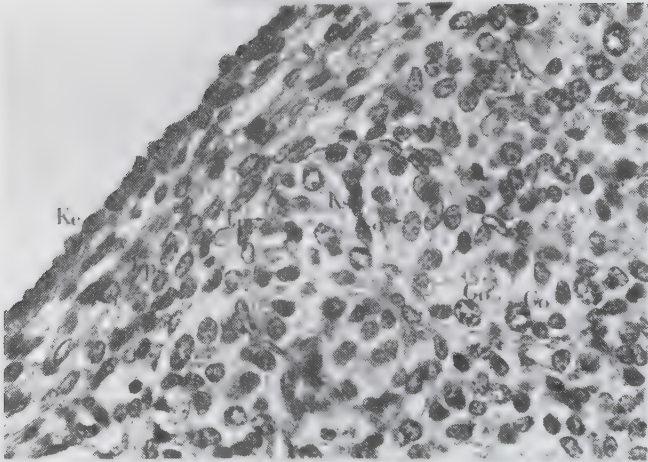
V. ZUSAMMENFASSUNG

1. An Hand der Literatur wird die Entwicklung und Reifung der Keimzelle und die Entwicklung von der undifferenzierten Gonade zum Hoden beschrieben.
2. Es wird die endokrine Funktion der fetalen Gonade im Hinblick auf ihren Einfluß in der Geschlechtsdifferenzierung diskutiert.
3. Die Ergebnisse bisheriger Hodengewebekulturen werden aus der Literatur zusammengestellt.
4. In den eigenen Untersuchungen werden 21 fetale und 32 postnatale Rinderhoden histologisch untersucht und parallel dazu in Gewebekultur gebracht. Die Subkulturen werden ebenso wie die histologischen Schnitte HE, Feulgen/Lichtgrün, Gomori/HE, Giemsa und teilweise auch v.Gieson und Fettrot gefärbt.
5. In den Subkulturen ist es möglich, drei verschiedene Zelltypen zu unterscheiden:
 - a) Die fibrozytenartigen Zellen, deren Kerne durchschnittlich $15 \times 10,5 - 40 \times 30 \mu$ groß sind, besitzen einen ovalen bis spindligen Kern mit einem in der Regel ebensolchen Zelleib.
 - b) Die epithelartigen Zellen, mit einem Kerndurchmesser von $10 - 16 \mu$, sind durch einen runden Kern mit meist 1-2 Nukleoli und einen polygonalen Zelleib gekennzeichnet.
 - c) Die Keimzellen haben im Ruhestadium einen Durchmesser von $13,4 \mu$, ihre Kerne messen $8 - 9 \mu$. Die Keimzellen sind in der Regel runde Zellen, mit meist runden bis ovalen Kernen, deren Kernchromatin eine staubkornartige Verteilung aufweist. Das Zellzytoplasma besitzt einen heller aufleuchtenden Randbezirk. Im Gegensatz zu den übrigen Zellen einer Kultur sind die Keimzellen in allen Färbungen intensiver angefärbt.
6. Die fibrozytenartigen Zellen überwiegen in den fetalen Hodenkulturen mit durchschnittlich 80-90%, in den postnatalen mit ca. 60-70%. Die epithelartigen Zellen umfassen in den ersteren 4-5%, in den letzteren 20-25%. Der Anteil der Keimzellen be-

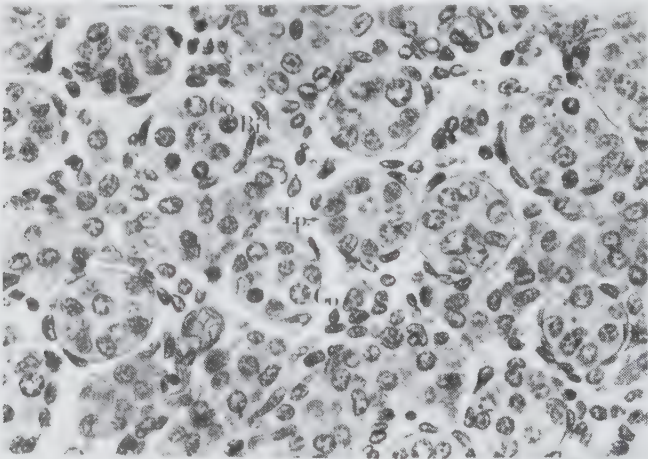
trägt in den fetalen Kulturen 5-10%, in den postnatalen 10-15%.

7. Die mitotische Aktivität ^(Chromosomen) der Somazellen beträgt 1% und weniger, die der Keimzellen in der Regel 60-70%.

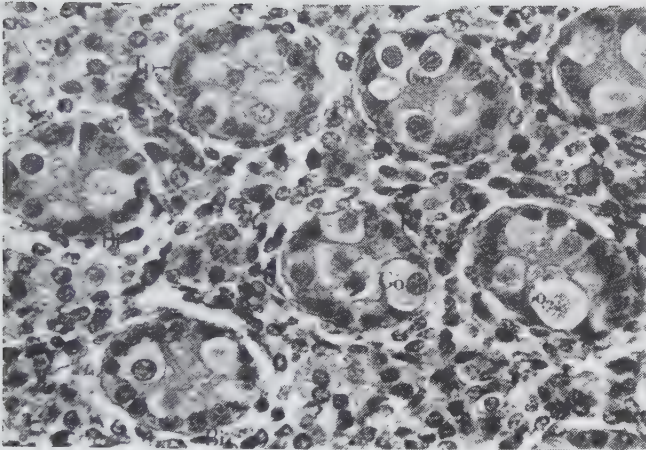
VI. ABBILDUNGEN



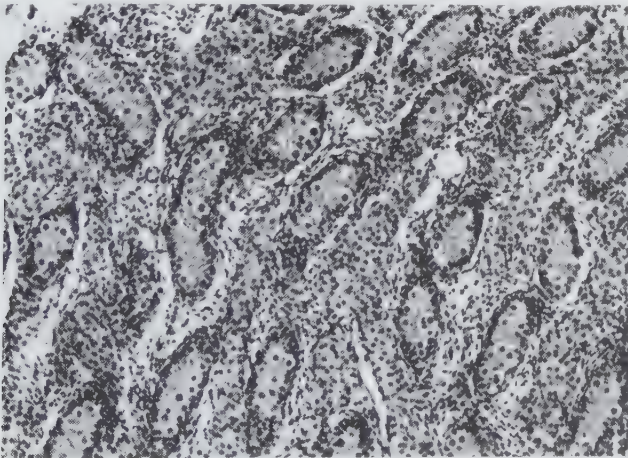
Hoden eines 7 Wo. alten Rinderfetus; HE; 480x;
Unter dem einschichtigen Keimepithel(Ke) folgt eine breite, aufgelockerte, sekundäre Tunica albuginea(Ta), darunter ein breiter Keimstrang(Kst), in diesem liegen Gonocyten(Go) und Coelomepithelzellen(Co) noch wirr durcheinander. Außen ist an den Keimsträngen bereits eine dünne Tunica propria(T.p.) erkennbar.(Abb.1)



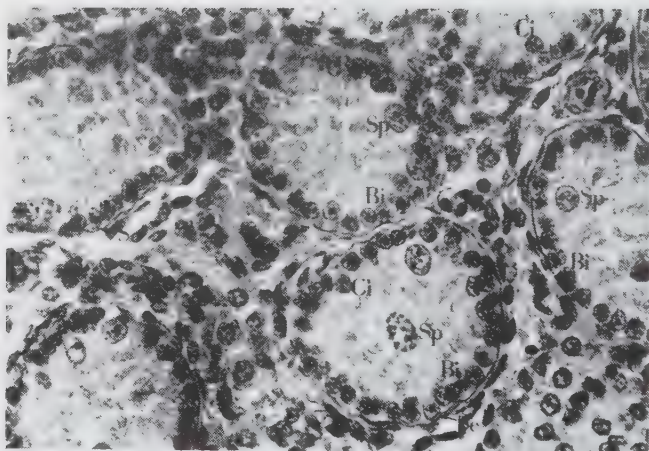
Hoden eines 12 Wo. alten Rinderfetus; HE; 480x;
Mehrere fetale Hodentubuli erkennbar. Auf der Tunica propria(T.p.) lagern teilweise schon geordnet, Bizzellen(Bi). Zwischen diesen und auch axial einige Gonocyten(Go). Im intertubulären Gewebe sind Zellgrenzen zu sehen. (Abb.2)



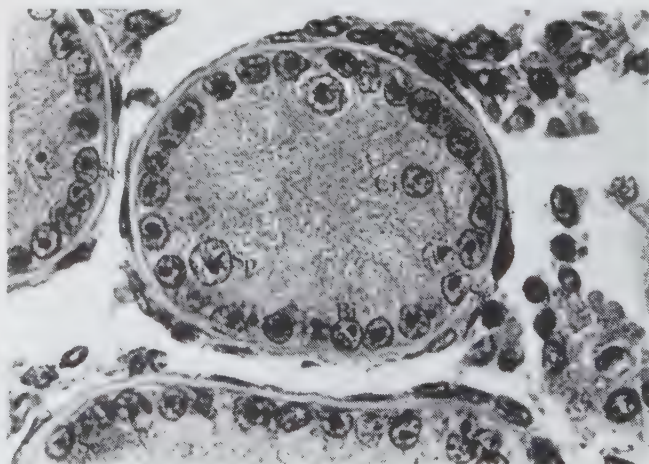
Hoden eines 13 Wo. alten Rinderfetus; Gömöri/HE ; 45ox; 1
In den fetalen Hodensträngen liegen Bis-Zellen (Bi)
palisadenähnlich auf der Tunica propria (T.p.) aufge-
reicht. Zwischen diesen und auch axial gelegen mehrere
Gonocyten (Go). (Abb.3)



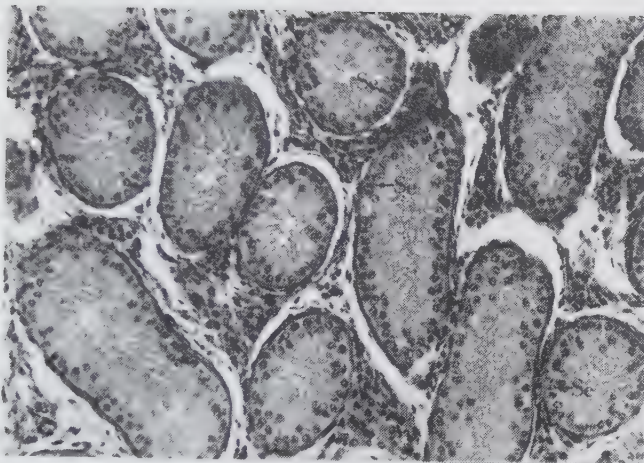
Hoden eines 17 Wo. alten Rinderfetus; HE; 180ox;
In einem sehr kernreichen intertubulären Stroma
liegen zahlreiche Hodenstränge. Auf der Tunica
propria(T.p.) lagern Bis-Zellen(Bi) dicht neben-
einander, zwischen ihnen und auch im Zentrum
Gonocyten (Go). (Abb.4)



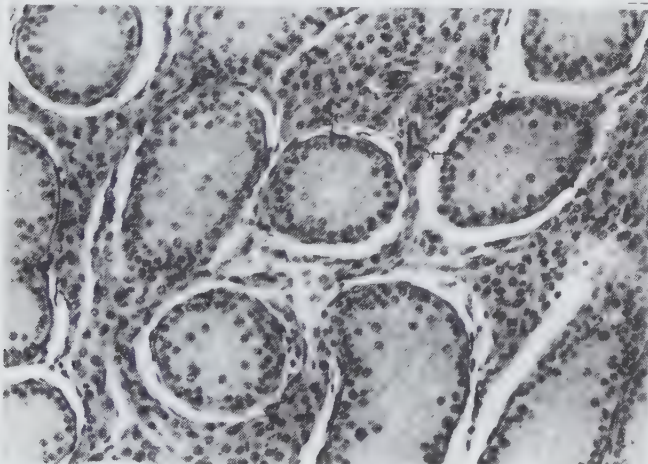
Hoden eines 6 Wo. alten Kalbes; HE; 480x;
Die Hodentubuli sind näher aneinander gerückt und
haben an Umfang zugenommen. Die Tunica propria ist
sehr ausgeprägt, auf dieser liegen Bis-Zellen(Bi),
in zwei Tubuli sind bereits Cis-Zellen(Ci) sichtbar.
In den Tubuli liegen einige Spermatogonien(Sp), ganz
vereinzelt bereits Sertolizellen(Se) vorhanden. (Abb.5)



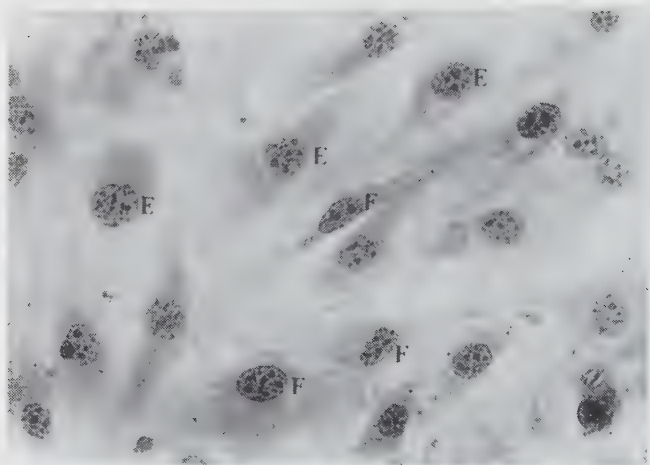
Hoden eines 10 Wo. alten Kalbes; HE; 750x;
Intertubulärer Raum reduziert, Bis-Zellen(Bi),
Cis-Zellen(Ci), Sertolizellen(Se) und Spermato-
gonien(Sp) in den Tubuli. (Abb.6)



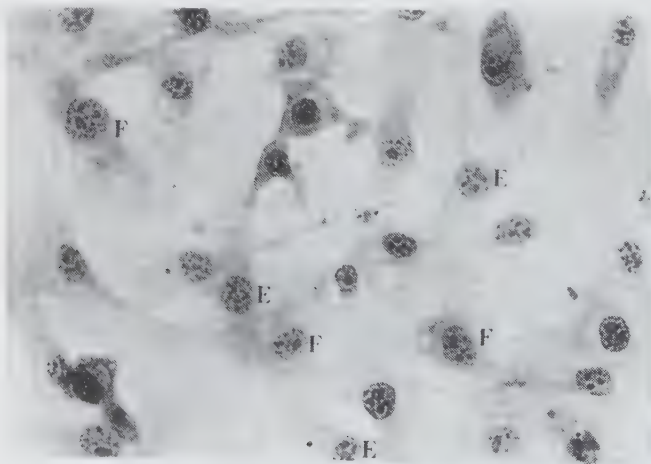
Hoden eines 13 Wochen alten Kalbes; HE; 480x;
Die Hodentubuli sind teilweise miteinander in Be-
rührung getreten. Zahlreiche Bis-Zellen, darunter
einige Sertolizellen(Se), einige Spermatogonien.(Abb.7)



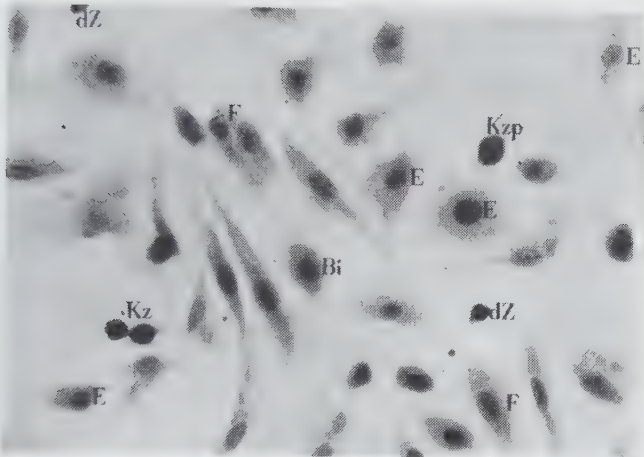
Hoden eines 16 Wo. alten Kalbes; HE; 480x;
Auf einer breiten Tunica propria befinden sich
Bis-Zellen, von denen sich einige zu Sertolizel-
len(Se) entwickelt haben, daneben viele Cis-Zel-
len und einige Spermatogonien.(Abb.8)



7 Tage alte Hodenzellsubkultur eines 20 wo. alten Rinderfetus; HE; 480x;
Zwischen fibrozytenartigen Zellen (F) befinden sich epithelartige Zellen (E). (Abb.9)



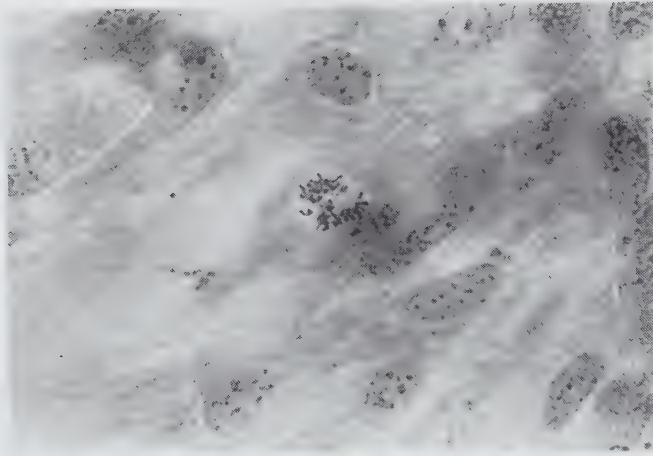
7 Tage alte Hodenzellkultur eines 20 wo. alten Rinderfetus; HE; 480
mehrere epithelartige Zellen (E) zwischen fibrozytenartigen Zellen (F) gelegen. (Abb.10)



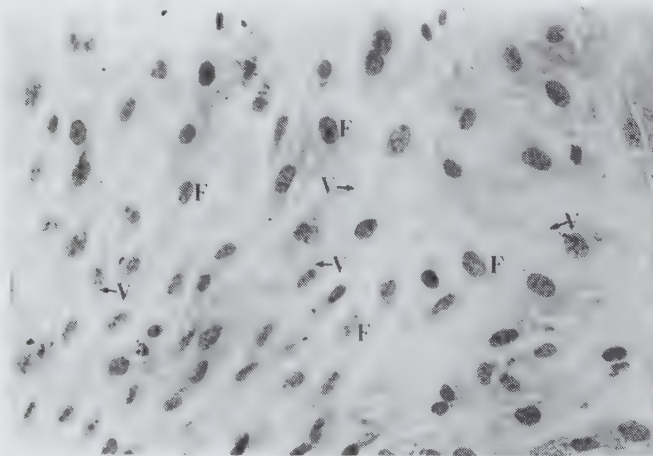
2 Tage alte Subkultur eines 40 wo. alten Rinderfetus; HE; 180x;
Einige epithelartige Zellen (E), von denen eine als Bis-Zelle (Bi) angesprochen werden kann, viele fibrozytenartige Zellen (F), 3 keimzellen (Kz), von denen eine kurze protoplasmatische Ausläufer besitzt (Kzp), 2 degenerierte Zellen (d.Z.) (Abb.11)



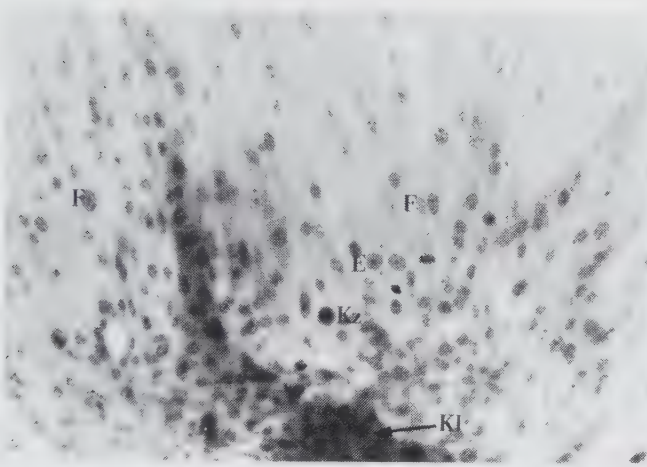
7 Tage alte Hodenzellkultur eines 20 wo. alten Rinderfetus; HE; 480x;
Junge fibrozytenartige Zellen mit langen protoplasmatischen Ausläufern. (Abb.12)



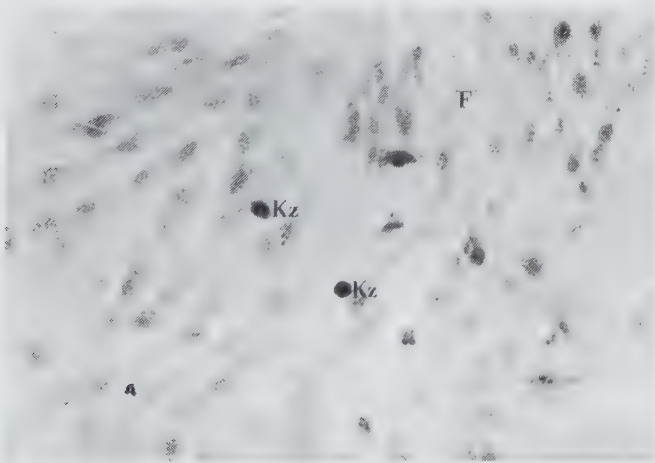
3 Tage alte Hodenzellsubkultur eines 15 wo. alten Rinderfetus; HE; 75ox;
Mehrere fibrozytenartige Zellen mit unterschiedlich großen Zellkernen. (Abb.13)



5 Tage alte Hodenzellsubkultur eines 12 Wo. alten Rinderfetus; HE; 18ox;
Die Monolayer besteht aus fibrozytenartigen Zellen(F), auffallend die zahlreichen runden bis polyedrischen Vakuolen(V) und die recht unterschiedlichen kerngrößen. (Abb.14)



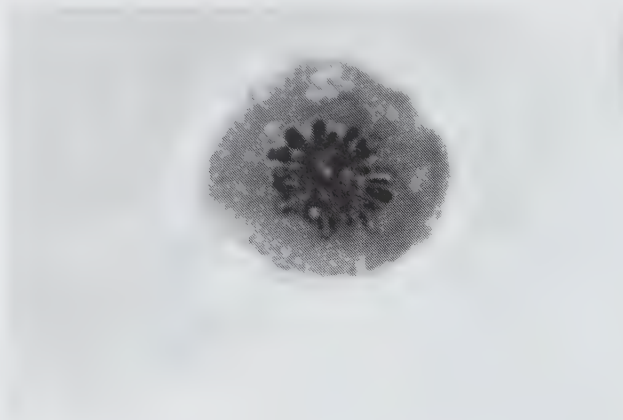
3 Tage alte Hodenzellsukultur eines 16 wo. alten Kalbes; v.Gieson; 180x;
Von einem Klon(Kl) ausgehendes Zellwachstum, in der Mehrzahl fibrozytenartige Zellen(F), einige epithelartige Zellen(E), eine Keimzelle(Kz), die sich durch ihre intensivere Anfärbarkeit von den übrigen Zellen deutlich abhebt. (Abb.15)



3 Tage alte Sukkultur eines postnatalen Hodens, Alter des Kalbes: 13 wo. Gömöri/HE; 180x;
Fibrozytenartige Zellen(F) überwiegen, von diesen heben sich die Keimzellen(Kz) deutlich ab, beide Keimzellen befinden sich in Mitose.(Abb.16)



2 Tage alte Hodenzellsubkultur eines 8 wo. alten Rinderfetus; HE; 480x; Keimzelle in Prophase mit kurzen protoplasmatischen Ausläufern. (Abb.17)



3 Tage alte Hodenzellsubkultur eines 16 Wo. alten Rinderfetus; v.Gieson; 480x; Keimzelle in Prophase. (Abb.18)

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- ASSEL-KROGH, H. 1960: The postnatal development of the reproductive organs with specific referring to puberty.
Acta Endocrin. Suppl. 40 Periodica.
- ders. 1961: The proliferation of the germ-cells in the testes of bull calves and young bulls.
Acta veter. scand. 2, 22-31.
- ALLEN, B. M. 1904: The embryonic development of the ovary and testes of the mammals.
Am. J. Anat. 3, 89-146.
- ARLY, L. E. 1954: Developmental Anatomy - A textbook and laboratory manual of embryology. / 6th ed.
W. B. Saunders S. N., Philadelphia 34.
(zit. n. S. ANTONIARINA und REECE 1957)
- BAKER, S. 1963: A quantitative and cytological study of germ-cells in human ovary.
Proc. Roy. Soc. London B 158, 415-433.
- BALFOUR, F. M. 1878: On the structure and development of the vertebrate ovary.
Quart. J. micr. Sci. 18, 383-428.
(zit. n. v. W. NIEMAYER, H., 1901)
- BASCOM, K. F. 1923: The interstitial cells of the gonads of cattle with especial reference to their embryonic development and significance.
Am. J. Anat. 31, 223-250.
- v. BECK, W. F. 1923: Die Entwicklung des Eierstocks beim Rind.
Z. f. Anat. u. Entw. gesch. 71, 458-558.
- BISCHOFFER, F. N. 1924: The development of the reproductive ducts and canals in the free-martin with comparison of the normal.
Am. J. Anat. 32, 247-261.

- BLANCH, J. A., and
JAKOBIKOWSKI, A. A. 1969: Differentiation of interstitial cells and
sertoli-cells in fetal guinea pig testes.
Am.J.Anat. 124, 211-219.
- BOUIN, F., and
ANGEL, P. 1903: Sur la signification de la glande inter-
stitielle du testicule embryonnaix.
Compt.rendus Soc.biol. 55, 1682-1684.
(zit.n.BURNS,K.,1961)
- BURNS,K.R. 1961: Role of hormones in the differentiation
of sex. In: W.C.Young, ed.: Sex and in-
ternal secretions, 3rd ed. Vol.1, The
Williams & Wilkins Co., Baltimore, 76-158.
- BURKL,W. 1954: Zum Problem der postnatalen Oogenese.
Wien.Klin.Wschr.19, 715-719.
- BÜHLER,A. 1894: Beitrag zur Kenntnis der Eibildung beim
Kaninchen und die Markstränge des Eier-
stocks beim Fuchs und Menschen.
Z.wiss.Zool. 58,314-339.
(zit.n.WOJKOWSKY,A.,1968)
- CHAPIN,C.I. 1917: A microscopic study of the reproductive
system of foetal free-martins.
J.Exp.Zool. 23, 453-482.
- CLERMONT,Y.,und
HUCKENS,C. 1961: Microscopic anatomy of the sex-cords and
seminiferous tubules in growing and adult
male albino rats.
Am.J.Anat. 108, 79-97.
- CUMINGE,D.,und
DUBOIS,R. 1969: Mécanisme de pénétration des gonocytes
primordiaux dans les épithéliums germi-
natifs attractifs, chez l'embryon de Poulet.
Comptes Rendus Acad.Sci.Paris 268,1200-1202.
- DANTSCHKOFF,F. 1952: Keimzelle und Gonade.
Z.f.Zellforsch.14, 323-384.
- DEEYRE,R. 1963: Sur la présence des gonocytes chez un
embryon humain au stade de la ligne pri-
mitive.
Comptes rendus de l'Assoc.des Anatom.28,
240-251.

- EVERETT, R. 1945: The present status of the germ-cell problem in vertebrates.
biol.Rev. 2, 45-55.
- EVEREV, T.,
ZHIVCOV, S., and
RUSSEV, L. 1970: LDH-isoenzymes in testicular cultures and human testes.
Human Heridity 20, 70-73.
- FAWCETT, W., and
BLOOM, W. 1969: A Textbook of Histology. 697-701
Saunders Comp. N.Y. and London.
- FEIL, C. 1912: Die Entwicklung der Harn- und Geschlechtsorgane. In: KLEIBL MALL: hdb.d.vergl.u.
exper.Entwick.gesch. Bd.2, 15-24.
- FERNER, H. 1957: Entwicklungsgeschichte des Menschen.
In: RHEINHARDT: Medizin.Grundrisse 8,
Leipzig, 22-24.
- FERRIS, R.D., and
FLOWRIGHT, W. 1958: Simplified methods for the production of monolayers of testis cells from domestic animals, and for serial examination of monolayer cultures.
J.rath.Bact. 75, 313-318.
- FRITZI-NIGGLI, H. 1961: Vererbung bei Mensch und Tier.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 3, 1-26.
- GROFF, A., and
OHNO, S. 1966: The presence of a common embryonic blastema for ovarian and testicular parenchymal (follicular, interstitial and tubular) cells in cattle, Bos Taurus.
Z.f.Zellforsch. 74, 505-528.
- GROFF, A., and
OHNO, S. 1943: The development of the sex cords in the gonads of man and mammals.
Am.J.Anat. 76/71, 359-389.
- HABERMehl, K.H. 1961: Die Altersbestimmung bei Haussäugetieren, Pelztieren und beim jagdbaren wild.
Paul Parey, Berlin.
- HAMPERT, W.D. 1968: Primordial germ cells in a 4,5 mm human embryo. Anatom.Rec. 154, 323-326.

- LEHRIGSCH, S., und 1962: Cytogenetics in cattle.
RAJAKOSKI, R. The Cornell.Vet. 52, 248-270.
- HESS, W.R., MAY, H.J., 1963: Serial cultures of lamb testicular cells
und FATTY, R.E. and their use in virus studies.
Am.J.Vet.Res. 24, 59-64.
- HOFFMANN, R. 1967: Methodik und Theorie der Chromosomenana-
lyse beim Haustier. Zugleich ein Beitrag
zur Erklärung der Zwickbildung.
Vet.Diss. München.
- HUCKENS, C. 1953: Microscopic anatomy of the sex cords and
seminiferous tubulus in growing and adult
male albino rats.
Am.J.Anat. 108, 79-97.
- JORDAN, R.T., 1961: Spermatocytogenesis with possible spermio-
KATSH, S., und de genesis of guinea pig testicular cells
STACKELBURG, N. grown in vitro.
Nature 192, 1053-1055.
- JOST, A. 1967: Steroids and sex differentiation of the
mammalian foetus.
Proc. II Ind Intern. Cong. Hormon. Steroids
Milan. 1966
Excerpta Med. Intern. Cong. Ser. 132, 74-81.
- JOST, A., und 1966: Données sur la migration des cellules ger-
FREFIN, J. minales primordiales du foetus de veau.
Arch. d'Anatom. microsc. 55, 161-186.
- KARG, H., und 1966: Testosterone / androstendione relation-
STRUCK, H.J. ship in the foetal bovine testes.
II Ind Int. Cong. Hormon. Steroids, Milan.
Exc. Med. Intern. Cong. Ser. 111, 541.
- LEHRIGSCH, S. 1961: Genetik - Ein Grundriß.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 22-24.
- KNUDSEN, O., und 1963: The spermiogenesis of the bull.
BRYNE, N. Acta veter. scand. 3, 141-160.

- KODARI, F., und
KODARI, K. 1966: In vitro cultivation of mammalian ser-
tolicells.
Proc.nat.Acad.Sci. USA 56, 1200-1206.
- KOHNO, N. 1925: Zur Kenntnis der Keimbahn des Menschen.
Arch.f.Gynäkologie 126, 1119-1146.
- KREHBIEL, E.B. 1963: Differentiation of gonads in bovine embryo.
Diss. Kansas State University
Ph.D. Thesis, Kansas.
- KREHBIEL, E.B., und
OLSEN, J. 1962: Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and
guinea pig as revealed by the "Periodic
Acid-Fuchsin sulfurous Acid" technique.
Am.J.Anat. 90, 167-215.
- MADIN, S.H.,
ANDERSON, J.C.,
und DABBY, N.B. 1957: The in vitro cultivation of tissues of
domestic and laboratory animals.
Am.J.Vet.Res. 18, 932-941.
- MATSCHKE, G.H., und 1969: Development and radioresponse of the pre-
ERIKSON, B.H. natal bovine testis.
Biolog.of Reprod. 1, 207-214.
- MAULEON, F. 1969: Oogenesis and folliculogenesis.
In: COLE und CURTIS: Reproduction in
Domestic Animals.
Acad. Press N.Y. and London, 180-215.
- MINTZ, B. 1960: Embryological phases of mammalian gameto-
genesis.
J.cell comp.physiology I, 56, 31-47.
- MISCHATSCH, G. 1933: Die Entwicklung des Kinderhodens von der
Geburt bis zur Geschlechtsreife.
Vet.Diss.Berlin.
- V.MOLLENDORF, E. 1957: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des
Menschen. Bd.III Harn- und Geschlechts-
organe. Teil 3: weibl.Harn- und Geschlechts-
organe. Springer Verlag.
- MIEMI, M., und 1969: Steroid-3 β -ol-dehydrogenase activity in
IKONEN, E. foetal Leydig Cells.
Nature 189, 511-569.

- CHIC, S., und
SILVER, A.
1965: Embryological basis of germ-cell chimerism.
Cytogenetics 4, 251-261.
- CHIC, S.,
SILVER, A.,
STENLUS, G.,
CARLSTAM, L. G.,
und FELLITZ, R. L.
1962: Possible germ cell chimeras among newborn
dizygotic twin calves (*Bos taurus*).
Cytogenetics 1, 258-265.
- PRICE, D., und
CRELIZ, L.
1965: The role of fetal androgen in sex differentiation in mammals.
In: DEHAAN, K. und DREKSLER, H., eds.
Organogenesis.
Molt, Rinehart and Winston Inc. New York
629-652.
- RAJAKOSKI, E., und
HAFIZ, E. S. E.
1964: Cytological differentiation of fetal
bovine gonads.
Cytogenetics 3, 193-200.
- ROOSCH-RUNGE, E. O.
und BARLOW, F.:
1953: Quantitative studies in human spermiogenesis. I. Spermatogonia.
Am. J. Anat. 93, 143-171.
- ROOSCH-RUNGE, E. O.
und GIESEL, O., jr.
1950: Quantitative studies on spermatogenesis
in the albino rat.
Am. J. Anat. 87, 1-23.
- RUBASCHNIK, W.
1909: Über die Urgeschlechtszellen bei Säug-
tieren. Anat. Hefte 119, Bd. 29, 603-652.
- ders.
1912: Zur Lehre von der Keimbahn bei Säug-
tieren. Über die Entwicklung der Keimdrüse.
Anat. Hefte 48, 343-411.
(zit. n. WOJKOWSKY, A., 1966)
- SAKAI, T. A.
1955: Studies on the development of the embry-
onic ovary in swine, cattle and horse.
Jap. J. Vet. Res. 3, 183-194.
- SALAFARLAN, A.,
und REECE, A. L.
1957: Normal development of the germinal epi-
thelium and seminiferous tubulus in the bull.
Am. J. Vet. Res. 18, 261-272.

- SLEVENING, R. 1969: Lehrbuch der vergleichenden Entwicklungsgeschichte. Paul Parey Berlin. 2.Auflage, 334-336.
- SIMKINS, S. 1928: The origin of sex cells in man. Am.J.Anat.41, 249-272.
- SCROBY, R. 1953: Clinical Genetics. C.V.Mosby, St.Louis 524. (zit.n.HOFFMANN, R. 1967)
- STARCK, D. 1965: Embryologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2.Auflage, 1-43.
- STEINBERGER, A. 1965: In vitro growth of mammalian testicular cells. Anat.Rec. 151,420 (Abstract).
- STEINBERGER, A., u. STEINBERGER, E. 1966: In vitro culture of rat testicular cells. Exp.Cell Res. 44,443-451.
- STEINBERGER, E., und VILAR, O. 1966: Cytochemical study of A⁵-3B-hydroxy-steroid dehydrogenase in testicular cells grown in vitro. Endocrin.79, 406-410.
- THOMSON, D. 1942: Comparative studies on gonade development in the rat, the pig and in cattle. Proc.Iowa Acad.Sci. 3,475-479.
- TSYPKIN, L.B. 1963: Cytological analysis of testicular tissue of monkey in conditions of in vitro monolayer trypsinized culture. Byull.eksp.Biol.Med.55, 96-101. (Russisch-Englische Zusammenfassung)
- ULBRICH, F. 1966: Zur Verwendung von Serum bei der Bereitung von Zellkulturen. Z.med.Labortechn.7,100-102.
- VILAR, O., STEINBERGER, A., u. STEINBERGER, E. 1966: Electron microscopy of isolated rat testicular cells. Z.f.Zellforsch.mikrosk.Anat.74, 529-538.

- v. VLOTEN, F. 1932: Die Entwicklung des Testikels und der Urogenitalverbindung beim Rind.
Z.f. Anat. u. Entwickl. gesch. 98, 578-649.
- WALDEYER, W. 1870: Eierstock und Ei.
Leipzig: Engelmann.
(zit. n. WOJKOŃSKY, A. 1968).
- WEISSMANN, D. 1885: Die Kontinuität des Keimplasmas.
Jena.
- WHITEHEAD, R. H. 1904: The embryonic development of the interstitial cells of Leydig.
Am. J. Anat. 3, 167-182.
- WILSON, K. 1926: Origin and development of the rete ovarii and rete testis in the human embryo.
Contr. Embryol. 17, 85-89.
- v. WINIWARTER, H. 1901: Recherches sur l'ovogenèse et l'organogenèse de l'ovaire des mammifères (lapin et homme).
Arch. Biol. 17, 33-199.
- WITSCHI, E. 1948: Migration of the germ cells of human embryo from the Yolk-Sac to the primitive Gonadal Folds.
Contr. Embryol. Carn. Inst. 32, 67-80.
- ders. 1965: Hormones and embryonic induction.
Arch. Anat. micros. Morph. exp. 54, 601-611.
- WOJKOŃSKY, A. 1968: Die Oogenese bei Mensch und Säugetier nach den Mitteilungen im Schrifttum der vergangenen 100 Jahre.
Vet. Diss. München.
- WOLFF, E., und ZONDEK, B. 1925: Die Kultur des menschlichen Ovarialgewebes und Amniongewebes.
Virch. Arch. 254, 1-16.
- ZIEFSCHEIDT, O., u. KRELLING, C. 1955: Lehrbuch der Entwicklungsgeschichte der Haustiere.
Paul Parey, Berlin, 2. Auflage, 5 ff.

ZONDEK, B., und
JOLFF, E.

1924: über die Züchtung von menschlichem Ovarialgewebe in vitro.
Zentralbl.f.Gynäkologie 48, 2193-2195.

Am Ende meiner Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr.E.WEISS für die Überlassung des Themas und für seine Unterstützung herzlich danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr.R.HOFFMANN und Herrn Dr.EL ETREBY für ihre Hinweise und stets gern gewährte Hilfe.

LEBENS LAUF

Am 28. November 1942 wurde ich, Herbert Stieger, als 5. Kind der Eheleute Franz und Anna Stieger geb. Schulten in Krefeld geboren.

Von Ostern 1948 bis Ostern 1952 besuchte ich die Volksschule in Krefeld und von Ostern 1952 bis Herbst 1957 die Albert-Schweitzer-Realschule in Krefeld. Im Herbst 1957 wechselte ich zum Gymnasium am Moltkeplatz in Krefeld über, an dem ich im Februar 1964 das Reifezeugnis erwarb.

Im Mai 1964 begann ich mit dem Studium der Veterinärmedizin an der Justus Liebig-Universität Gießen. Nach 9 Semestern bestand ich im Mai 1969 das Tierärztliche Examen.

Vom 1. Juli 1969 bis zum 15. August 1970 war ich wissenschaftliche Hilfskraft am veterinär-pathologischen Institut der veterinärmedizinischen Fakultät Gießen.

Am 18. Juli 1970 heiratete ich Fräulein Claudia Hausmann.

Während meiner Zeit im veterinär-pathologischen Institut fertigte ich meine Dissertation an. Seit dem 15. August 1970 bin ich Assistent an der Medizinischen Veterinärklinik II.

